

Aus der Klinik für Innere Medizin,
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer
in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Angiologie
am Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin Erfurt
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Leiterin: Prof. Dr. E. Glusa

**Einfluss von Thrombin und Thrombinrezeptor-aktivierenden
Peptiden (TRAP) auf die Mitogenese von Gefäßmuskelzellen:
Untersuchungen zur Signaltransduktion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ina-Gabriele Richter, geb. Wilke
aus Arnstadt

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 11.4.2003.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. M. Wolf

Coreferent: Prof. Dr. R. Göke

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aqua dest	aqua destillata
AS	Aminosäure
ATE	Antithrombin-Einheiten
BCA-SMC	bovine coronary artery smooth muscle cells
bFGF	basic fibroblast growth factor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CM	konditioniertes Medium
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
FCS	fetales Kälberserum
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor-like growth factor
HRP	horseradish peroxidase
IE	Einheit zur Kennzeichnung der Enzymaktivität
kD	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	Protease activated receptor

PDGF	platelet derived growth factor
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-(3)-phosphat-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPP	Platelet-poor plasma
PRP	Platelet-rich plasma
PTX	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SEM	standard error of the mean
SMC	smooth muscle cells
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Thrombinstruktur	9
1.2	Thrombinrezeptor.....	10
1.3	Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	12
1.3.1	G-Proteine.....	12
1.3.2	G-Protein-regulierte Effektorproteine	12
1.3.3	Aktivierung der MAPK	16
1.4	Der mitogene Effekt von Thrombin.....	18
1.5	Ziel der Untersuchungen.....	22
2	METHODEN	23
2.1	Kultivierung der SMC.....	23
2.2	Bestimmung des [³ H]-Thymidineinbaus in SMC	24
2.3	Bestimmung der p44/42-MAP-Kinase in glatten Muskelzellen.....	24
2.3.1	Kultur, Stimulation und Lyse der SMC.....	24
2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.3.3	Western-Blot.....	26
2.3.4	Nachweis der MAP-Kinase	26
2.4	Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel	27
2.5	Messung der ADP-Ribosylierung von G _i -Proteinen.....	29
2.6	Bestimmung von bFGF in konditioniertem Medium.....	29
2.7	Messung der Plättchenaggregation	30
2.8	Substanzen	31
2.8.1	Proteine und Peptide.....	31
2.8.2	MAP-Kinase -Kinase (MAPKK- oder MEK)-Inhibitoren	32
2.8.3	p38-MAPK-Inhibitor	33
2.8.4	EGFR-Inhibitor.....	33
2.8.5	PI3-Kinase-Inhibitor.....	33
2.9	Statistik.....	34

3	ERGEBNISSE.....	35
3.1	[³ H]-Thymidineinbau in SMC als Proliferationskontrolle.....	35
3.1.1	Thrombin stimuliert den [³ H]-Thymidineinbau: Konzentrations- Wirkungsbeziehung.....	35
3.1.2	Effekte von Thrombin und TRAP auf den [³ H]-Thymidineinbau in BCA-SMC	36
3.1.3	Ist PAR-4 als weiterer Thrombinrezeptor an der Thrombin-induzierten DNA-Synthese beteiligt?.....	38
3.1.4	Effekte eines p38-MAPK-Inhibitors auf den Thrombin-induzierten [³ H]- Thymidineinbau.....	40
3.1.5	Einfluss eines PDGF-Antikörpers auf den Thrombin-induzierten [³ H]- Thymidineinbau.....	41
3.2	Effekte von Thrombin und TRAP auf die Phosphorylierung der p44/42- MAP-Kinase in glatten Muskelzellen.....	43
3.3	Einfluss der MAPKK (MEK)-Inhibitoren PD98059 und U0126 auf die Thrombin-induzierte DNA-Synthese und die p44/42-MAPK-Phosphorylierung durch Thrombin und TRAP	44
3.4	Einfluss eines bFGF-Antikörpers auf den Thrombin-induzierten [³ H]- Thymidineinbau und die Thrombin- bzw. TRAP-vermittelte p44/42-MAPK- Phosphorylierung	48
3.5	Effekte des spezifischen EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 auf den Thrombin- induzierten [³ H]-Thymidineinbau und die Thrombin- bzw. TRAP-vermittelte p44/42-MAPK-Phosphorylierung.....	52
3.6	Rolle der PI3-Kinase bei der p44/42-MAPK-Aktivierung und der Thrombin- induzierten DNA-Synthese	54
3.7	Beteiligung Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiver G-Proteine am mitogenen Signalweg von Thrombin.....	56
3.8	Einfluss von Thrombin und TRAP-6 auf den cAMP-Spiegel	58
3.9	Effekte von Thrombin und TRAP auf die Phosphorylierung der p38-MAP- Kinase in glatten Muskelzellen.....	61
4	DISKUSSION	63
4.1	Thrombin und TRAP aktivieren die p44/42-MAPK in BCA-SMC, aber nur Thrombin initiiert die DNA-Synthese.....	63
4.2	PDGF spielt keine Rolle bei der Thrombin-induzierten Mitogenese in BCA-SMC, aber bFGF ist beteiligt.....	65
4.3	Eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors ist weder für die p44/42-MAPK- Aktivierung noch für die DNA-Synthese notwendig.....	66

4.4	Die PI3-Kinase ist in die Thrombin-induzierte Mitogenese in BCA-SMC involviert, reguliert aber nicht die p44/42-MAPK.....	66
4.5	Thrombin und TRAP beeinflussen den intrazellulären cAMP-Spiegel nicht.....	67
4.6	Pertussis Toxin (PTX)-insensitive G-Proteine sind an der Signalweiterleitung beteiligt.....	68
4.7	Auch die p38-MAPK wird durch Thrombin und TRAP aktiviert	69
4.8	Ausblick	70
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	ANHANG.....	88
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	88
7.2	Lebenslauf.....	90
7.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer	92
7.4	Danksagung.....	93
7.5	Ehrenwörtliche Erklärung.....	95

1 Einleitung

Nach wie vor gehören Herz- und Kreislauferkrankungen in allen industrialisierten Ländern zu den wichtigsten Krankheits- und Todesursachen. Zumeist liegen diesen Erkrankungen atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand zugrunde (Lüscher et al., 1996; Tanner et al., 1999). Die zellulären und molekularen Mechanismen der Entstehung einer Atherosklerose sind erst teilweise aufgeklärt. Die Kenntnis dieser Mechanismen ist jedoch für eine wirksame und ursachenorientierte Therapie dieser Erkrankungen unabdingbar. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Grundlagenforschung auf diesem Gebiet leisten.

Die selben Mechanismen, die den Blutaustritt nach einer Gefäßverletzung verhindern, können auch für die Entstehung von thrombotischen und atherosklerotischen Gefäßerkrankungen verantwortlich sein (Rabbani & Loscalzo, 1994; Tanaka & Sueishi, 1993; Thompson & Smith, 1989). So weisen sowohl Thrombose als auch Atherosklerose in ihrer Entstehung und ihrem Verlauf Merkmale der physiologischen Hämostase und Gefäßreparation auf. Die Atherosklerose führt im intakten Gefäß zum Umbau der Gefäßwandstruktur und -architektur. Dies wird auch als „*Remodeling*“ bezeichnet. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zur Einengung des Gefäßlumens mit Stenosebildung und nachfolgenden organspezifischen Komplikationen durch Minderdurchblutung, die mit einem erhöhten thrombotischen Potential einhergehen. Als eine Behandlung des akuten Koronarsyndroms mit thrombotischem Gefäßverschluss hat sich die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) bewährt. Jedoch entwickelt sich bei 30-40 % der Patienten ca. 3-6 Monate nach erfolgter Ballonkatheterdilatation eine Restenose (Bauters et al., 1992; Hamon et al., 1995; Hombach et al., 1995). Der Prozess der Restenose nach Angioplastie ist das Ergebnis von komplexen Interaktionen wie Thrombozytenanhäufung, Thrombenbildung, Freisetzung von chemotaktischen, vasoaktiven und mitogenen Faktoren, Migration und Proliferation von Gefäßmuskelzellen, Zellinfiltration, verstärkte Bildung extrazellulärer Matrix und vaskuläres Remodeling. Die auf das Trauma folgende, sofortige Thrombozytenadhäsion und -aktivierung führt zur Freisetzung verschiedener Mediatoren aus den Thrombozyten (Kinlough-Rathbone et al., 1983; Wilentz et al., 1987). Die freigesetzten Mediatoren, insbesondere der Plättchenwachstumsfaktor (*platelet derived growth factor*, PDGF) (Ferns et al., 1991) und der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*; EGF) (Oka &

Orth, 1983), lösen chemotaktische und proliferationsfördernde Effekte in Muskelzellen aus. Das charakteristische Merkmal der Restenose nach PTA ist eine Intimahyperplasie. Die zelluläre Hauptkomponente der Neointima stellen die glatten Muskelzellen (SMC) der Gefäßwand dar (Clagett et al., 1986). Neben diesen Muskelzellen wurden auch Makrophagen und T-Zellen (Jonasson et al., 1986) in den Läsionen nachgewiesen. Diese Zellproliferation ist eine allgemeine Antwort der Gefäßwand auf eine Schädigung. Die Muskelzellen proliferieren aber nicht nur, sondern ändern auch ihren Phänotyp: so treten die kontraktilen Filamente zurück (Manderson et al., 1989); die Zellen dieses „synthetisierenden Phänotyps“, sowie Endothelzellen und Fibroblasten produzieren vermehrt Extrazellulärmatrix (Hamon et al., 1995). Neben der Proliferation findet auch eine Migration der Muskelzellen aus der Media in die Intima statt. Dies führt zur Ausbildung einer Neointima (Schwartz et al., 1995).

Thrombin ist an der Neointimabildung entscheidend beteiligt. Der Verlust der athrombogenen Eigenschaften der Gefäßwand nach einer Endothelschädigung und die nachfolgenden zellulären und molekularen Prozesse, die letztlich zur Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen führen, schließen auch thrombinvermittelte zelluläre Reaktionen ein. Der Thrombinrezeptor wird in atherosklerotischen Läsionen in großem Umfang exprimiert (Nelken et al., 1992). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Thrombin zu inflammatorischen und proliferativen Veränderungen der Gefäßwand beitragen kann, welche zur Atherogenese führen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in normalen Arterien der Thrombinrezeptor hauptsächlich in der Endothelzellschicht exprimiert wird, wohingegen PAR-1 im humanen Atherom vorwiegend in Gebieten, die reich an Makrophagen und SMC sind, nachweisbar ist (Nelken et al., 1992). Die mechanische Wandschädigung arterieller Gefäße führt zu einer verstärkten Expression des Thrombinrezeptorgens (Coughlin et al., 1992). Dies wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass eine vermehrte Thrombinrezeptor-mRNA-Bildung sechs Stunden nach Ballonkatheter-Angioplastie bei glatten Muskelzellen der Gefäßmedia von Ratten auftritt (Wilcox et al., 1994). Weitere Befunde zeigten, dass sich nach einer mechanisch induzierten Gefäßschädigung lokal die Konzentration von Thrombin erhöht (Nelken et al., 1992). Außerdem konnte im Tiermodell die Restenose nach Angi-

oplastie durch die Behandlung mit einem Antagonisten gegen den Thrombinrezeptor PAR-1 gehemmt werden (Andrade-Gordon et al., 2001).

Thrombin, das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade, besitzt sowohl enzymatische als auch hormonartige Eigenschaften (Dery et al., 1998). Es wird bei Schädigung von Gefäßwänden durch den extrinsischen Weg der Blutgerinnung gebildet und entsteht überwiegend an der Oberfläche zirkulierender Blutplättchen nach proteolytischer Aktivierung aus dem Prothrombokinasekomplex. Die primäre Aufgabe des Thrombins besteht darin, lösliches Fibrinogen in unlösliche Fibrinmonomere umzuwandeln. Gleichzeitig können auch zirkulierende Thrombozyten aktiviert werden, die mit der Fibrinmatrix das Blutgerinnsel bilden. Dieses inkorporiert auch proteolytisch aktives Thrombin und schützt es damit vor löslichen Plasmainhibitoren. Während der Thrombolyse wird das Blutgerinnsel durch fibrinolytische Enzyme aufgelöst, wobei aktives Thrombin freigesetzt wird. Die zellulären Effekte von Thrombin sind nicht nur auf Thrombozyten beschränkt, sondern lassen sich auch bei anderen Zellen nachweisen (Dery et al., 1998). So reguliert Thrombin inflammatorische Prozesse in Leukozyten und Makrophagen (Bar-Shavit et al., 1992) und kann mitogene Effekte in Lymphozyten (Naldini et al., 1993), mesenchymalen Zellen (Clohisy et al., 1990), Fibroblasten (Kahan et al., 1992) und glatten Muskelzellen (Graham & Alexander, 1990) auslösen (Macfarlane et al., 2001). Demzufolge trägt die Wachstumsstimulation durch Thrombin während Wundheilung, inflammatorischen Prozessen oder Infektionen mit zur Pathogenese von Atherosklerose, Vaskulitis und Hyperplasie nach Gefäßwandverletzungen bei.

1.1 Thrombinstruktur

Mit der 1989 erstmals von Bode et al. durchgeführten Röntgenkristallstrukturanalyse des humanen α -Thrombins wurden grundsätzliche strukturelle Eigenschaften des Thrombins aufgeklärt (Bode et al., 1989). Das aktive α -Thrombin besteht aus zwei durch eine Disulfidbrücke kovalent verbundenen Polypeptidketten, der (beim Menschen) 36 Aminosäuren (AS) langen A-Kette und der 259 AS langen B-Kette (Degen et al., 1983). Das globuläre α -Thrombin ist ein ellipsoides Molekül, an dessen „Vorderseite“ sich eine tiefe canyonartige Spalte („*active-site cleft*“) mit den katalytisch aktiven Aminosäuren befindet. Durch diese besonders tiefe und enge *active-site*-Spalte ist das aktive Zentrum des Thrombins schlecht

für makromolekulare Substrate zugänglich. Dies trägt mit zu der besonderen Spezifität des α -Thrombins bei. Die spezielle räumliche Anordnung der Aminosäuren verleiht dem Thrombin außergewöhnliche elektrostatische Eigenschaften (Bode et al., 1992; Karshikov & Bode, 1993). Seine A- und B-Ketten besitzen eine besonders große Zahl ionisierbarer Gruppen, die nicht statisch über die gesamte Oberfläche verteilt, sondern zu Ladungsclustern zusammengefasst sind. Diese Ladungsverteilung im Thrombinmolekül führt zu besonders hohen positiven bzw. negativen elektrostatischen Feldstärken an und außerhalb der Moleküloberfläche des Thrombins. Ein Bereich besonders hoher positiver Ladungsdichte wird als „Anionen-Bindungsregion“ I (*anion binding exosite*) oder auch „Fibrinogen-Erkennungsregion“ bezeichnet. Über diese "*anion binding exosite*" bindet Thrombin spezifisch an negativ geladene Sequenzen und über die katalytische Region entfaltet es seine proteolytische Aktivität, welche für die beobachteten zellulären Effekte benötigt wird (Glenn et al., 1980; van Obberghen-Schilling et al., 1985; Bode et al., 1989; 1992; Coughlin, 2000; Macfarlane et al., 2001).

1.2 Thrombinrezeptor

Thrombin gehört zur Familie der multifunktionellen Serinproteasen (Dery et al., 1998). Es aktiviert seine Rezeptoren durch enzymatische Spaltung. Diese werden daher als Protease-aktivierte-Rezeptoren (PAR's) bezeichnet. 1991 wurde der erste PAR kloniert (Rasmussen et al., 1991; Vu et al., 1991a). Inzwischen sind vier Subtypen bekannt: PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4 (Vu et al., 1991a; Nystedt et al., 1994; Ishihara et al., 1997; Xu et al., 1998). Nur PAR-2 wird nicht durch Thrombin, sondern durch Trypsin aktiviert. Der bovine Thrombinrezeptor wurde 1996 kloniert (Ma et al., 1996).

Nachdem Thrombin über die "*anion binding exosite*" an PAR-1 gebunden hat, wird dieser im aminoterminalen Bereich zwischen der Position Arginin-41 und Serin-42 gespalten. Dadurch entsteht ein neuer Aminoterminus, beginnend mit der Sequenz SFLLRN, der als "*tethered ligand*" fungiert (Vu et al., 1991b). Dies macht den Thrombinrezeptor einzigartig, da sich sein eigentlicher Ligand im Rezeptormolekül selbst befindet. Synthetische Peptide, die dem neuen Aminoterminus des gespaltenen Thrombinrezeptors entsprechen, können ebenfalls an den Rezeptor binden und einige der Thrombineffekte nachahmen. Struktur-

Aktivitätsanalysen der Thrombin-Rezeptor aktivierenden Peptide (TRAP) zeigten, dass ein Minimum von fünf Aminosäuren (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg) für die volle Aktivität des humanen Thrombinrezeptors benötigt wird (Vouret-Craviari et al., 1992; Vassallo et al., 1992; Scarborough et al., 1992; Chao et al., 1992; van Obberghen Schilling et al., 1993). Der PAR-1 gehört zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist mit einer Vielzahl von zellulären *pathways*, wie Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen, Protein-Tyrosinkinasen und monomeren G-Proteinen, Hydrolyse von Phosphoinositiden und Calcium-Mobilisierung verbunden (Grand et al., 1996; Macfarlane et al., 2001). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) weisen keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität auf. Mitglieder dieser Rezeptorenklasse besitzen die Fähigkeit, durch Kopplung an heterotrimere Guanin-Nukleotid bindende regulatorische Proteine (G-Proteine) ihre Signale in das Innere der Zelle weiterzuleiten. GPCR sind durch eine typische tertiäre Struktur gekennzeichnet. Sie bilden sieben transmembranale Helices, die durch extra- und intrazelluläre Schleifen verbunden sind. Die Kopplung der G-Proteine erfolgt an der Innenseite der Membran (Abb. 1).

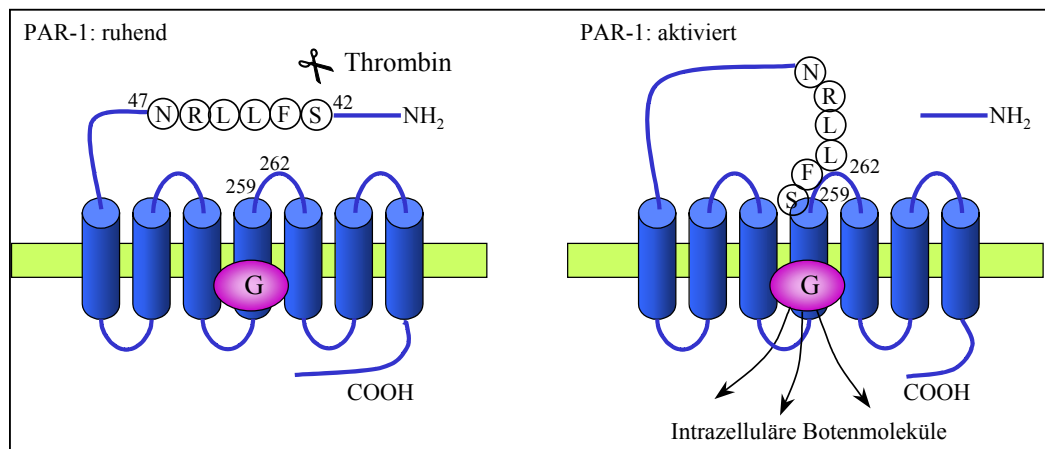


Abb. 1: Thrombin-Rezeptor PAR-1 in ruhendem und aktiviertem Zustand (d.h. durch Thrombin gespalten), modifiziert nach: (Hollenberg & Compton, 2002).

1.3 Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

1.3.1 G-Proteine

Die G-Proteine bestehen aus drei heterologen Untereinheiten (α , β und γ), die nur im inaktiven Zustand, d.h. im GDP-gebundenen Zustand, assoziiert vorliegen. Die Kopplung des Liganden an den Rezeptor führt zu einer nicht kovalenten Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein. Dadurch katalysiert der Rezeptor den Austausch von GTP gegen gebundenes GDP an der α -Untereinheit des G-Proteins. Daraufhin dissoziiert die α -Untereinheit von dem stabilen β - γ -Dimer ab. Sowohl die α -Untereinheit als auch die β - γ -Untereinheit können nun verschiedene Signale in der Zelle weiterleiten. Die α -Untereinheiten der G-Proteine werden, auf Sequenzähnlichkeiten beruhend, in die vier Strukturfamilien G_s , G_i , G_q und $G_{12/13}$ eingeteilt (Harden et al., 2001; Neves et al., 2002). Die G-Proteine der G_s -Familie sind Cholera-Toxin-Substrate und stimulieren die Adenylatzyklase, Ca^{2+} -Kanäle und möglicherweise auch andere Kanäle. Die G_i -Familie ist die größte Gruppe der α -Untereinheiten. Die G_i -Proteine sind durch Pertussis-Toxin (PTX) inaktivierbar und hemmen in der Regel die Adenylatzyklase. Die G_q -Familie ist Cholera-Toxin- und PTX-insensitiv und enthält die G-Protein-Regulatoren der Phospholipase C- β -Isoenzyme (PLC- β). Die Komplexität der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion wird noch gesteigert durch die Existenz von verschiedenen Genen, die für β - und γ -Untereinheiten kodieren. So sind derzeit sechs G-Protein- β -Untereinheiten und elf G-Protein- γ -Untereinheiten bekannt und die meisten Kombinationen dieser β - und γ -Untereinheiten ergeben funktionelle Dimere (Clapham & Neer, 1997, 1993; Gilman, 1995; Post & Brown, 1996; Neves et al., 2002).

1.3.2 G-Protein-regulierte Effektorproteine

Aktivierte G-Proteine geben das Signal an eine Vielzahl von nachgeschalteten Effektormolekülen weiter. Zu diesen gehören unter anderem die Adenylatzyklase, Phosphodiesterasen, Phospholipasen, Ionen-Kanäle, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K), Serin-Threonin-Proteinkinasen und -Phosphatasen, Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors; GEFs*) für kleine GTP-bindende Proteine (Gutkind, 1998b; Neves et al., 2002).

Die Adenylatzyklase z.B. katalysiert die Bildung von 3'-5'-zyklischem AMP (cAMP) aus ATP. Die meisten der zellulären Effekte von cAMP werden durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) vermittelt (Bornfeldt & Krebs, 1999). Die Adenylatzyklase kann durch die aktivierte α -Untereinheit der G_s -Proteine, Ca^{2+} /Calmodulin, die Proteinkinase C (PKC) oder die β - γ -Untereinheiten der G-Proteine aktiviert werden (Iyengar, 1993; Taussig & Gilman, 1995; Neves et al., 2002). Auch das Diterpen Forskolin ist in der Lage, die Adenylatzyklase zu aktivieren, indem es direkt, d.h. ohne Interaktion mit exogenen Rezeptoren, am katalytischen Zentrum der Adenylatzyklase angreift. Durch die α -Untereinheiten der G_i -Proteine, Ca^{2+} oder durch β - γ -Untereinheiten kann sie inaktiviert werden.

Eine Aktivierung der Phospholipase C führt zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) als sofortige duale *second messengers* und zur Mobilisierung von Ca^{2+} sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) als zweites Paar von Botenmolekülen (Berridge & Irvine, 1989; Michell, 1989; Neves et al., 2002). Diese beiden *second messenger*-Arten fördern ihrerseits wieder eine Reihe von biochemischen Reaktionen, welche die Aktivierung anderer *second messenger pathways* einschließt. Durch diese können z.B. die Phospholipase A_2 oder Phospholipase D aktiviert werden.

Interessanterweise konnte für G_{α_q} und $G_{\alpha_{12/13}}$ aber nicht für G_{α_i} eine Aktivierung von Rho-abhängigen Signaltransduktionswegen gezeigt werden (Mao et al., 1998).

Von PAR-1 ist bekannt, dass es sowohl an G_{α_q} , welches die Phospholipase C- β aktiviert (Brass, 1995), an G_{α_i} , welches die Adenylatzyklase inhibiert (Hung et al., 1992), als auch an $G_{\alpha_{12/13}}$, gekoppelt sein kann (Grand et al., 1996; Aragay et al., 1995; Majumdar et al., 1999; Macfarlane et al., 2001; Hollenberg & Compton, 2002). Die Signaltransduktion über PAR-2, PAR-3 und PAR-4 erfolgt über bisher noch nicht charakterisierte G-Proteine (Hollenberg & Compton, 2002).

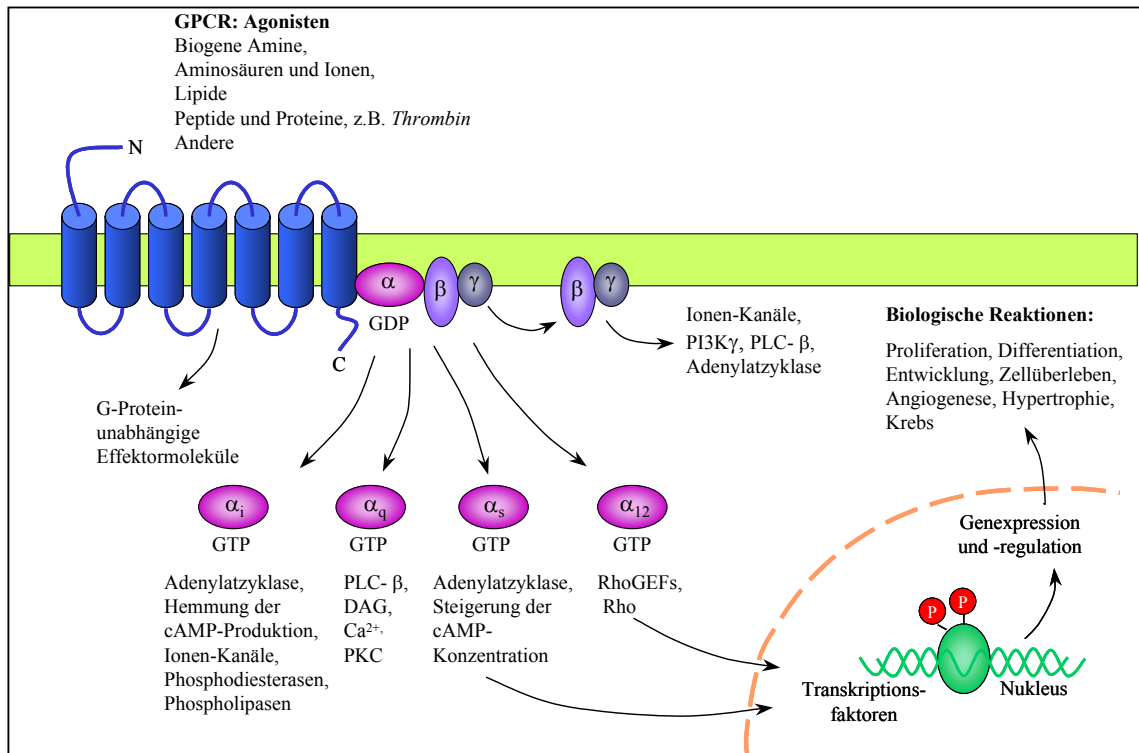


Abb. 2: GPCR-Effektorproteine (Marinissen & Gutkind, 2001)

Verschiedene Moleküle, die in der Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen eine wichtige Rolle spielen, werden auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen, aktiviert. Dazu gehört auch das niedrigmolekulare G-Protein Ras, welches eine zentrale Funktion in der Induktion der Mitogenese durch Tyrosinkinase-rezeptoren, z.B. des epidermalen Wachstumsfaktors (*epidermal growth factor*; EGF) ausübt. In seinem aktiven, GTP-gebundenen Zustand, aktiviert Ras die Serin/Threonin-Kinase Raf. Dies führt zu einer Aktivierung einer zytoplasmatischen Protein-kinase-Kaskade. Für heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit G_q , G_i und G_s interagieren, wurde gezeigt, dass die Funktion von Ras für die Mitogenese benötigt wird (LaMorte et al., 1993; Kupperman et al., 1993; Cook et al., 1993; Neves et al., 2002; Lin et al., 2002). Auch das kleine GTP-bindende Protein Rho wird durch Aktivierung des Thrombinrezeptors aktiviert, wodurch die MAPK-Kaskade initiiert wird (Donovan & Cunningham, 1998; Suidan et al., 1997; Seasholtz et al., 1999; Neves et al., 2002).

Die PI3-Kinase (Walker et al., 1998) und Tyrosinkinasen der Src-Familie (Rao et al., 1995; Cichowski et al., 1992) werden ebenfalls durch PAR-1 aktiviert, wobei die Src-Aktivierung

durch β - γ -Untereinheiten wahrscheinlich nicht durch eine direkte Proteininteraktion erfolgt, sondern vermutlich die PI3-Kinase intermediär zwischengeschaltet ist (Lopez-Illasaca et al., 1997). Diese Verbindung ist ein Hinweis auf einen potentiellen Mechanismus, bei dem heterotrimere G-Proteine Nicht-Rezeptortyrosinkinasen regulieren können.

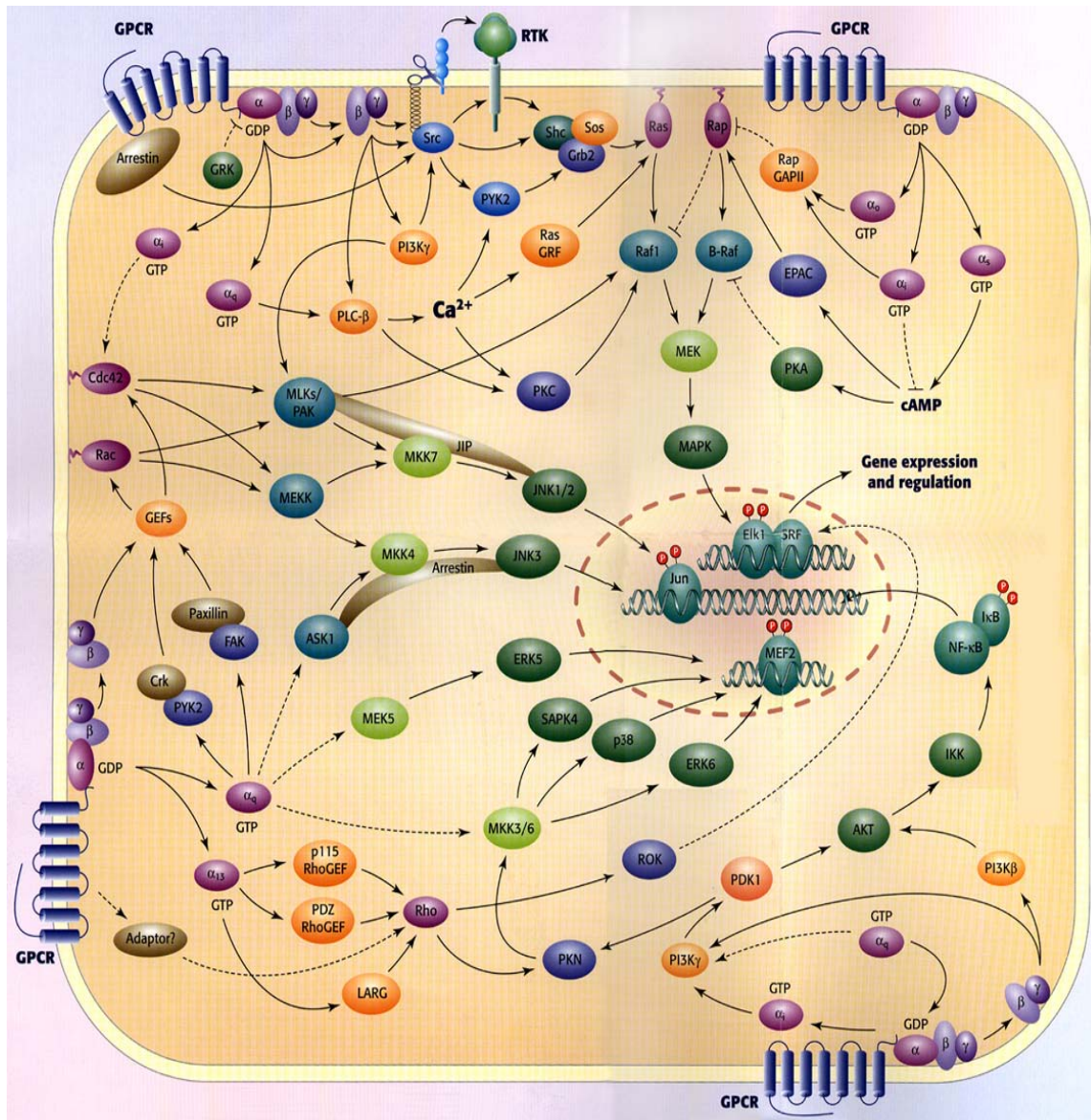


Abb. 3: Signalnetzwerke G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) (Marinissen & Gut-kind, 2001)

1.3.3 Aktivierung der MAPK

Einer der wichtigsten Signaltransduktionswege, die durch Ras initiiert werden, ist die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (Sears & Nevins, 2002). Die MAPK werden am Ende einer dreistufigen Signalkaskade aktiviert: eine MAPK Kinase Kinase (MKKK) aktiviert eine MAPK Kinase (MKK), die wiederum die MAPK aktiviert (Segar & Krebs, 1995). Die MAPK *superfamily* (Robinson & Cobb, 1997) umfasst eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die extrazelluläre Signale weiterleiten und so an der Regulation des Zellwachstums, der Zellteilung und –differenzierung beteiligt sind (Pierce et al., 2001). Nach ihrer Aktivierung gelangen sie in den Zellkern, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktivieren können und somit direkt an der DNA-Synthese beteiligt sind (Pearson et al., 2001). Inzwischen sind schon sechs Unterfamilien klassifiziert worden: die 42 und 44 kD *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) ERK1 und ERK2, auch gemeinsam als p42/p44-MAPK bezeichnet, die c-Jun aminoterminal Kinase (JNK), die p38-MAPK, die ERK5 oder *big* MAPK1 (Gutkind, 2000) sowie ERK7 (Abe et al., 1999) und MOK (Miyata et al., 1999). Diese Kinasen zeigen einen gemeinsamen Mechanismus der Regulation durch ihre vorgeschalteten Regulatoren, wozu die Phosphorylierung von Tyrosin- und Threonin-Resten in einem konservierten aktiven Zentrum durch ihre entsprechende dual-spezifische Kinase (MEK) gehört. Diese Phosphorylierung ist die Voraussetzung für ihre enzymatische Aktivität.

Zu den am besten charakterisierten MAPK gehören die p42/p44-MAPK, die p38-MAPK und die JNK (Luttrell, 2002). Diese drei Kinase-Signalkaskaden sind zueinander stark homolog und im Laufe der Evolution relativ konserviert geblieben (Widmann et al., 1999). Zwischen den einzelnen Kaskaden gibt es zahlreiche Verbindungen, die mit dem Begriff “*cross talk*” beschrieben werden (Gutkind, 1998a; Michel et al., 2001). Inzwischen sind vier p38-MAPK kloniert worden (α , β , γ , δ) (Gutkind, 2000). Sie werden als Antwort auf zellulären Stress, Ischämie/Reperfusion und auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert (Hedges et al., 1998). Nachdem die p38-MAPK lange Zeit nur als streß-aktivierte MAPK galt, konnte kürzlich ihre Beteiligung an der Mitogenese sicher belegt werden (Kanda et al., 2001b). *Upstream*-Regulatoren der p38-MAPK sind z.B. Tyrosinkinasen der Src-Familie (Nagao et al., 1998), p21-aktivierte Kinasen und kleine G-Proteine der Rho-

Familie (Garrington & Johnson, 1999). Der JNK-*pathway* umfaßt Rac und Cdc42, zwei Mitglieder der Rho-Familie von GTPasen (Coso et al., 1995). Die p42/p44-MAPK phosphoryliert unter anderem die p90^{rsk}-Kinase (p90 ribosomale S6 Kinase), die Phospholipase A₂ und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (Widmann et al., 1999).

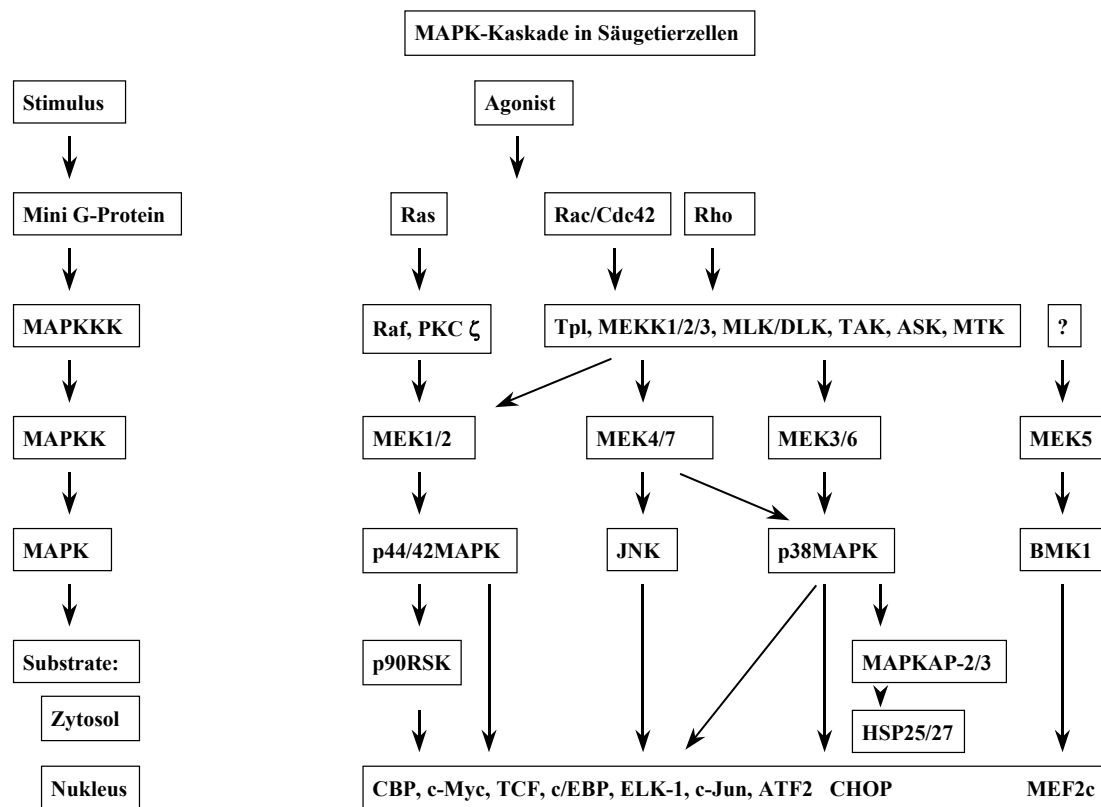


Abb. 4: MAPK-Kaskaden: p44/42, JNK, p38 und BMK1

Links ist ein allgemeines Schema gezeigt, wobei ein Stimulus ein mini-Guanin-Nukleotid-bindendes Protein (G-Protein) durch Austausch von GDP gegen GTP aktiviert. Das GTP-gebundene G-Protein aktiviert dann eine Kinase-Kaskade, welche eine MAPKKK (MEKK), eine MAPKK (MEK) und am Schluß die MAPK selbst umfaßt. Die Kaskade der MAPK-Familie wird als paralleler Signalweg dargestellt. Jede Untergruppe wird durch spezifische Aktivierungssequenzen charakterisiert. Generell existiert für jede MAPK-Untergruppe eine MEK, außer für JNK und p38. Weniger Spezifität ist für die Aktivierung der MEKs durch die MEKKs gegeben. Ebenso wenig spezifisch erfolgt die Aktivierung der *downstream*-Substrate, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, welche durch verschiedene MAPK reguliert werden (Takahashi & Berk, 1998; Houslay & Kolch, 2000).

Die Aktivierung der MAPK kann nicht nur über verschiedene Kinasen und Ras erfolgen, sondern ebenso über eine Aktivierung der MAPK durch Transaktivierung eines Wachstumsfaktorrezeptors, wie z.B. über den EGF-Rezeptor (Daub et al., 1996; Luttrell, 2002).

1.4 Der mitogene Effekt von Thrombin

Der mitogene Effekt von Thrombin wurde 1975 erstmals an Sekundärkulturen von Hühnerembryozellen beobachtet (Chen & Buchanan, 1975). Danach wurde entdeckt, dass Thrombin das Wachstum von Säugetierzellen, wie Fibroblasten von Maus, Hamster und Mensch stimuliert (Carney et al., 1978; Pohjanpelto, 1978; Cherington & Pardee, 1980). Über mitogene Thrombinwirkungen wurde auch in Lymphozyten (Chen et al., 1976), makrophagenähnlichen Tumorzelllinien (Bar-Shavit et al., 1986) und Gefäßmuskelzellen (Huang & Ives, 1987; Bar-Shavit et al., 1990; Stouffer et al., 1993; McNamara et al., 1993) berichtet.

Die Thrombin-induzierte Proliferation von Gefäßmuskelzellen (SMC) wird entweder direkt durch eine Stimulation des Thrombinrezeptors oder indirekt durch die Modulation von Effekten von anderen Wachstumsfaktoren vermittelt. Unter Verwendung von TRAP und Protein-Tyrosinkinase-Inhibitoren konnten einige Forschungsgruppen zeigen, dass Thrombin zusätzlich zur Aktivierung seines GPCR noch Protein-Tyrosinkinase-Aktivität benötigt, um einen mitogenen Effekt auszulösen (Weiss & Maduri, 1993; van Obberghen-Schilling et al., 1995; Zwick et al., 1999). Verschiedene Studien belegen auch, dass die Sekretion autokriner Wachstumsfaktoren an der Thrombin-induzierten Proliferation von SMC beteiligt ist (Berk, 2001). Trotz schneller Thrombinrezeptor-Aktivierung und vergleichbarer Zeit für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus wird bekanntlich eine längere Thrombin-Einwirkungszeit für ein maximales Wachstum der SMC benötigt als für den Plättchenwachstumsfaktor (*platelet derived growth factor*, PDGF) (Bachhuber et al., 1995). Diese Studien deuten darauf hin, dass nach Thrombinrezeptor-Aktivierung Sekundärmechanismen von Bedeutung sind, um ein maximales Zellwachstum zu erzielen.

PDGF ist der am besten charakterisierte Migrationsfaktor. Er ist außerdem ein autokriner Wachstumsfaktor, für den eine Beteiligung an der Thrombin-induzierten Mitogenese angenommen wird (Kanthou et al., 1992; Stouffer et al., 1993; Cucina et al., 1999; Okazaki et al., 1992; Bydlowski et al., 1998). Die Bedeutung der autokrinen Produktion von PDGF

wurde in Experimenten offensichtlich, bei denen neutralisierende Antikörper gegen PDGF den Thrombin-induzierten Einbau von ^3H -Thymidin um 30 % reduzierten (Stouffer et al., 1993). Dagegen konnte eine PDGF-Beteiligung an der Faktor Xa-induzierten Mitogenese ausgeschlossen werden (Bretschneider et al., 2000). Weiss & Maduri (1993) zeigten, dass der mitogene Effekt von Thrombin auf die Bildung von basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) zurückzuführen ist. Die Hemmung des mitogenen Effekts durch einen neutralisierenden Antikörper gegen PDGF konnte dagegen nicht bestätigt werden. Außerdem aktiviert der bFGF-Rezeptor zelluläre Tyrosinkinasen (Ullrich & Schlessinger, 1990). Es wurde der Nachweis erbracht, dass ein neutralisierender Antikörper gegen bFGF den mitogenen Effekt von Thrombin um 63 % vermindert (Weiss & Maduri, 1993). Wird bFGF gleichzeitig mit Thrombin zu SMC-Zellkulturen gegeben, so wird offensichtlich die Proliferation der SMC gesteigert (Weiss & Maduri, 1993; Bretschneider et al., 1997). Der synergistische Effekt von Thrombin und bFGF auf die Mitogenese und den Inositol-Metabolismus weist daraufhin, dass Konvergenzpunkte in ihren Signaltransduktionswegen bestehen. Von Zhong et al. (1992) wurde gezeigt, dass bFGF einen Anstieg der Thrombinrezeptor-mRNA in kultivierten SMC bewirkt. bFGF ist ein äußerst starkes Mitogen für SMC (Lindner et al., 1991), welches auch von den SMC selbst gebildet wird (Gospodarowicz et al., 1988). bFGF hat kein Signalpeptid für den Export über den klassischen Weg mittels endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat, wird aber über einen Exozytose-Mechanismus ausgeschüttet (Mignatti et al., 1992). Auch neueste Untersuchungen belegen, dass die thrombin-induzierte Mitogenese in SMC durch eine autokrine bFGF-Bildung vermittelt wird (Cucina et al., 2002).

Weiterhin wurden die autokrine Bildung von Epiregulin (Taylor et al., 1999), eine *heparin binding EGF-like growth factor* (HB-EGF)-vermittelte Transaktivierung des EGF-Rezeptors (Kalmes et al., 2000; Prenzel et al., 1999) und eine Beteiligung des *Insulin-like growth factor-1 receptors* (Du et al., 2001) im Zusammenhang mit der Thrombin-induzierten Proliferation von Gefäßmuskelzellen beschrieben.

In Bezug auf die Fähigkeit von TRAP ebenfalls eine mitogene Antwort auszulösen, gibt es kontroverse Ergebnisse. Vouret-Craviari et al. (1992) zeigten, dass TRAP in Hamsterfibroblasten keine Mitogenese induziert. Sowohl Thrombin als auch TRAP führten in

Fibroblasten zu einer Aktivierung der MAPK, jedoch bewirkten beide Substanzen einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf dieser Aktivierung (Vouret-Craviari et al., 1993). Für die fehlende mitogene Wirkung von TRAP wurde das Ausbleiben einer langanhaltenden Aktivierung der MAPK als Ursache angesehen. McNamara et al. (1996) stellten dagegen einen gleich starken Effekt von Thrombin und TRAP auf die Proliferation von Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta fest. Wiederum wurde die Bildung sekundärer Wachstumsfaktoren nachgewiesen, die auf die Thrombinrezeptorstimulation zurückgeführt wurde. Auch in humanen SMC stimuliert TRAP die Mitogenese (Kanthou et al., 1995).

Es wird nicht nur die Beteiligung sekundärer Wachstumsfaktoren an der Thrombin-induzierten Mitogenese diskutiert, sondern es wurde auch die Transaktivierung des EGF-Rezeptors (EGF-R) durch Thrombin in Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta nachgewiesen (Kanda et al., 2001a). Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombin-induzierte EGF-R-Tyrosinphosphorylierung zu einer Aktivierung der p38-MAPK führte, da der EGF-R-Inhibitor AG1478 die p38-MAPK-Aktivierung konzentrationsabhängig hemmte. Ebenso wurde die Thrombin-induzierte DNA-Synthese durch AG1478 vermindert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die EGF-R-Transaktivierung und nachfolgende p38-MAPK-Aktivierung für die Thrombin-induzierte Proliferation von Gefäßmuskelzellen benötigt wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese Vielzahl von unterschiedlichen Ergebnissen von der untersuchten Spezies, sowie vom Zelltyp abhängen. Auch Varela et al. zeigten in einer Studie eine speziesabhängige Antwort arterieller SMC auf Thrombin (1998). Allerdings betonten Orsini et al. (1999), dass die spezies-spezifischen Reaktionen auf potentielle Mitogene keine Unterschiede im grundsätzlichen mitogenen Signaltransduktionsmechanismus reflektieren, sondern vielmehr vom Expressionsgrad und der Kopplung und/oder Regulation von verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren bestimmt werden. Der Ursprung der SMC ist ebenfalls zu berücksichtigen, da selbst zwischen arteriellen und venösen SMC innerhalb einer Spezies Unterschiede zu verzeichnen sind. Diese Tatsache wurde auch bei Untersuchungen zum Thrombinrezeptor PAR-4 offensichtlich. So wurde beispielsweise nur in humanen SMC aus der Vena saphena funktionell aktiver PAR-4 nachgewiesen (Bretschneider et al., 2001). Dagegen konnte in SMC der humanen Aorta bzw.

von Koronararterien keine PAR-4 mRNA und kein Ca^{2+} -signalling durch ein PAR-4-aktivierendes Peptid festgestellt werden (Andrade-Gordon et al., 1999; Ahn et al., 2000).

Die Vielfalt der Signaltransduktionswege des Thrombins und die physiologischen bzw. pathophysiologischen Effekte in Zellen des Blutgefäßsystems sind in Abb. 5 zusammengefasst (Patterson et al., 2001):

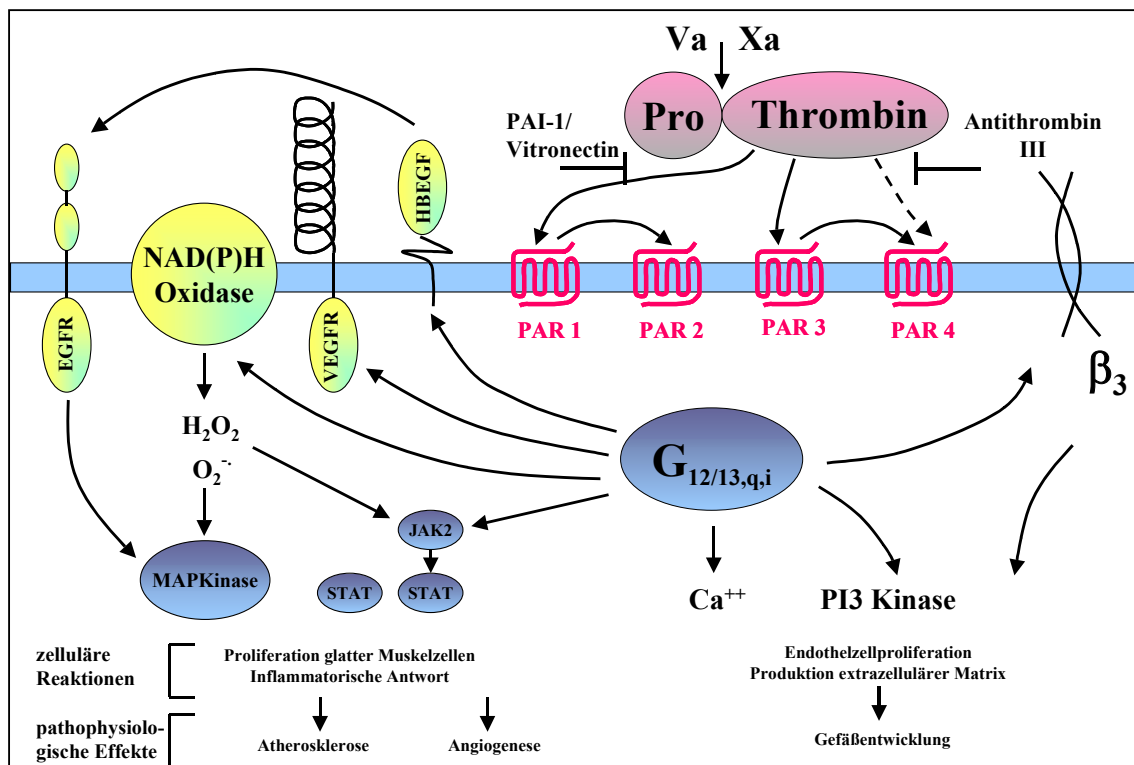


Abb. 5: Thrombin „signalling“ in Zellen des Blutgefäßsystems.

1.5 Ziel der Untersuchungen

Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen tragen zu einer Verdickung der Gefäßwand bei, die in vielen Fällen bei Gefäßwandschädigung infolge kardiovaskulärer Erkrankungen auftreten kann. Daher ist die pharmakologische Beeinflussung der Restenose nach einer Angioplastie bei akutem Koronarsyndrom, die auf eine Proliferation von glatten Muskelzellen zurückzuführen ist, von großer Bedeutung. Damit stellt sich die Frage nach den Mechanismen, die diese Intimaproliferation initiieren und steuern. Umfassende Kenntnisse über intrazelluläre Abläufe in den Gefäßmuskelzellen sind deshalb erforderlich, um pharmakologisch in diese Prozesse eingreifen zu können.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag geleistet werden zur Aufklärung der intrazellulären Signaltransduktion bei der Thrombin-induzierten Mitogenese und deren Verflechtung mit anderen, die Mitogenese steuernden Signalen. Hauptziel dabei war eine nähere Charakterisierung der Signaltransduktionswege der Thrombin-induzierten Mitogenese, da diese noch nicht vollständig aufgeklärt sind und zum Teil sehr kontroverse Ergebnisse vorliegen. Von besonderem Interesse waren vergleichende Untersuchungen von Thrombin und TRAP, da Unterschiede bezüglich der stimulatorischen, mitogenen Wirkung auf SMC beschrieben wurden. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die MAPK als Schwerpunkt eines beispielhaften Signalweges, der sicher mit der Mitogenese zusammenhängt (Payne et al., 1991). Mittels Inhibitoren, welche einzelne Signaltransduktionsproteine spezifisch hemmen, sollte herausgefunden werden, welche dieser Überträgermoleküle in die Thrombinrezeptor-vermittelte MAPK-Aktivierung und nachfolgende Mitogenese involviert sind. Entscheidend bei dieser Fragestellung war, ob Thrombin und TRAP die selben Signaltransduktionsproteine aktivieren. Dies würde man zunächst erwarten, aber es ist bekannt, dass nur Thrombin und nicht TRAP für SMC aus Rinderkoronararterien (*bovine coronary artery smooth muscle cells*, BCA-SMC) mitogen ist (Bretschneider et al., 1997).

2 Methoden

2.1 Kultivierung der SMC

Die SMC wurden aus Koronararterien von adulten Rindern (*bovine coronary artery smooth muscle cells*, BCA-SMC) nach der Methode von Fallier-Becker et al.(1990) bzw. der *explant*- Technik (Chamley-Campbell et al., 1979) präpariert und in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C und unter CO₂-Begasung (5 %) kultiviert. Als Zellkulturgefäße wurden je nach späterem Verwendungszweck entweder Gewebekulturschalen (150 x 25 mm, 35 x 10 mm; Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) oder Multiwellplatten (6-Loch, 24-Loch; Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) gewählt. Das Zellkulturmedium enthielt 80 % HAM's F-12 *Nutrient Mixture* (Gibco/BRL, Eggenstein), 20 % Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium (DMEM mit Natriumpyruvat und 1000 mg/l Glucose; Gibco/BRL, Eggenstein), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (Penicillin-Streptomycin, 10000 IU/ml; Gibco/BRL, Eggenstein) und 10 % fetales Kälberserum (FCS; Gibco/BRL, Eggenstein). Für das Waschen der Zellen wurde Dulbecco's *phosphate buffered saline* ohne Calcium und Magnesium (D-PBS; Gibco/BRL, Eggenstein) benutzt. Die Kulturmedien und Reagenzien wurden vor Gebrauch im Wasserbad (Julabo SW-20C, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) auf 37°C vorgewärmt.

Nachdem die Zellen konfluent waren, wurden sie für die Versuche eingesetzt bzw. zur weiteren Kultivierung verdünnt. Dafür wurden sie einmal mit 10 ml D-PBS gewaschen und mit 7 ml Trypsin-EDTA (10x, vor Gebrauch 1:10 mit PBS verdünnt; Gibco/BRL, Eggenstein) nach einer Einwirkzeit von ca. 5 min vom Boden der Kulturschale abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde die Zellsuspension in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, mit einer sterilen Einwegpipette (Greiner, Frickenhausen) resuspendiert und bei 900 rpm 10 min zentrifugiert (Biofuge 15R; Heraeus, Hanau). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und nach Bedarf in einem Endvolumen von 20 ml pro Kulturschale ausgesät und weiter kultiviert.

Subkonfluente Zellen (50%- 80% der Kulturschale bewachsen) der Passagen 4-10 wurden für die Experimente verwendet.

2.2 Bestimmung des [³H]-Thymidineinbaus in SMC

Die BCA-SMC wurden dazu in 24-Loch-Platten ausgesät und 72 h bis zur Subkonfluenz gezüchtet. Dann wurden die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und die nachfolgenden 24 h in FCS-freiem Medium kultiviert, um die Zellen damit in der G₀-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren. In dieser Phase inkorporieren die Zellen minimale Mengen an [³H]-Thymidin und können anschließend mit einem Agonisten stimuliert werden. Die Stimulation erfolgte in FCS-freiem Medium. Jede Bestimmung wurde als Dreierbestimmung (Triplett) durchgeführt. Nach einer 20-stündigen Inkubationsperiode im Brutschrank bei 37°C / 5 % CO₂ wurden die Zellen für weitere 4 h mit 1 µCi/ml [³H]-Thymidin ([Methyl-³H]-Thymidin, 2,0 Ci/mmol, wässrige Lösung mit 1,0 mCi/ml; NEN, Brüssel) inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit eiskaltem D-PBS gewaschen, einmal mit eiskalter HClO₄ (0,3 M; Merck, Darmstadt) gespült, noch einmal mit eiskaltem D-PBS gewaschen und durch 30-minütige Inkubation in 0,1 M NaOH (Merck, Darmstadt) bei 37°C gelöst. Aliquots von 200 µl wurden mit 3 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold™ XR, LSC-Cocktail; Packard, Groningen, Niederlande) aufgefüllt und der [³H]-Thymidineinbau durch Liquid-Szintillationsmessung (*Liquid Scintillation Counter* Wallac 1410; Wallac-ADL-GmbH, Freiburg) bestimmt.

2.3 Bestimmung der p44/42-MAP-Kinase in glatten Muskelzellen

2.3.1 Kultur, Stimulation und Lyse der SMC

Zunächst wurden die BCA-SMC in Gewebekulturschalen (35 x 10 mm; Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) in Kulturmedium mit 10 % FCS ausgesät. Nachdem die Kulturschalen subkonfluent bewachsen waren, wurde das FCS-haltige Medium durch FCS-freies Kulturmedium ersetzt und die Zellen für weitere 48 h im Brutschrank kultiviert. Die nachfolgende Stimulation erfolgte nach einem vorgegebenen Zeitschema. Nach Ablauf der Stimulation wurde das Medium schnell von den Kulturschalen abgesaugt und je Schale 100 µl Lysepuffer (62,5 mM Tris-HCl [pH 6,8; 25°C], 2 % w/v SDS, 10 % Glycerin, 50 mM DTT, 0,1 % Bromphenolblau) zugegeben, um die Stimulation abzustoppen. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Einweg-Zellschabers (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) von den Kulturschalen abgekratzt und die Zellysate in eiskalte Eppendorf-Hütchen (1,5 ml;

Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Bis zur Analyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot wurden die Zellysate bei -70°C gelagert.

Vor dem Auftragen der Proben auf das SDS-Polyacrylamidgel wurden diese zunächst kurz mit Ultraschall (LABSONIC U; B. Braun, Melsungen) behandelt, im Anschluß 5 min bei 97°C gekocht und kurz abzentrifugiert (1 min, 16000g; Biofuge 13, Heraeus, Hanau).

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein SDS-PAGE mit einem 10 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel wie folgt vorbereitet: Für das Trenngel (Volumen 15 ml) wurden 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8), 5 ml Acrylamid ("Rotiphorese Gel 30": gebrauchsfertige, stabilisierte, 30 %ige Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid in aqua dest.; Roth, Karlsruhe) und 347 mM SDS gemischt und mit der Zugabe von 6 µl TEMED (Sigma, Deisenhofen) und 150 µl 10 %igem Ammoniumpersulfat (Sigma, Deisenhofen) wurde die Polymerisation gestartet. Diese Lösung wurde nun schnell bis ca. 1,5 cm unterhalb der oberen Kante zwischen die Glasplatten (8,3 x 10,2 cm) gegossen und mit Isopropanol (100 %; Sigma, Deisenhofen) überschichtet, um einen gleichmäßigen Gelabschluß zu schaffen. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min wurde das Isopropanol wieder abgeschüttet, der Zwischenraum mit reichlich aqua dest. gespült und das Sammelgel (Volumen 4 ml) bis zur oberen Kante der Glasplatten daraufgegossen. Dieses bestand aus 0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8), 670 µl Acrylamid, 347 mM SDS, 4 µl TEMED und 40 µl Ammoniumpersulfat. Das Auspolymerisieren des Sammelgels dauerte ca. 30 min. Danach wurde das Gel in die Gelkammer (Mini-Protean® II *Electrophoresis Cell*; Bio-Rad, München) eingespannt, die Geltaschen mit Laufpuffer Rotiphorese® SDS-PAGE (10x, 1:10 mit aqua dest. verdünnt; Roth, Karlsruhe) gespült und die Proben auf das Gel aufgetragen. Jeweils 20 µl der aufbereiteten Lysate wurden pro Geltasche des Sammelgels einpipettiert und die Proben 1 h bei 200 V aufgetrennt. Als Marker wurden 10 µl Molekulargewichtsstandard (*Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range*; BIO-RAD, München) und 10 µl eines biotinylierten Molekulargewichtsstandards (*Biotinylated Protein Marker, Broad Range*; BioLabs, Schwalbach) ebenfalls 5 min bei 97°C gekocht, kurz abzentrifugiert (1 min, 16000g; Biofuge 13) und in die erste bzw. letzte Geltasche aufgetragen.

2.3.3 Western-Blot

Nach dem Gellauf wurden die beiden Glasplatten entfernt und das Gel zusammen mit der kurz in Methanol (100 %; Sigma, Deisenhofen) benetzten und danach gewässerten Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF, Immobilon™-P Transfer Membrane; Millipore, Eschborn) 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris base, 192 mM Glycin, 10 % Methanol; pH 8,5) unter leichtem Schwenken äquilibriert. Anschließend wurde das Gel auf die PVDF-Membran gelegt, beidseitig mit puffergetränkten Filterpapieren und Kunststoffhaltern stabilisiert und in die Blotkammer (Mini Trans-Blot® *Electrophoretic Transfer Cell*; Bio-Rad, München) eingesetzt. Die Blotkammer wurde zur Kühlung mit einem Eistank versehen und es wurde eine Spannung von 100 V für 1 h angelegt. Dadurch wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran transferiert.

2.3.4 Nachweis der MAP-Kinase

Der Nachweis der interessierenden Proteine erfolgte auf immunologischem Wege mittels spezifischem monoklonalem bzw. polyklonalem Erstantikörper, welcher durch einen speziess-erkennenden Zweitantikörper, der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, erkannt wird. Man bedient sich der Fähigkeit dieses Enzyms, die chemische Substanz Luminol so umzusetzen, dass dabei Chemolumineszenz entsteht. Das Signal wird analog zur Autoradiographie auf Röntgenfilmen festgehalten. Dazu wurde der ECL-Kit der Fa. Amersham (Braunschweig) verwendet.

Als erstes wurde die PVDF-Membran 90 min bei Raumtemperatur in einer 5 %igen Magermilch-Lösung in TBS-T-Waschpuffer (*Tris-buffered saline*, 20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween® 20; pH 7,6) auf dem Wipptisch (Biometra, Göttingen) geschwenkt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach Entfernen der Blockierlösung wurde die Membran ohne weiteren Zwischenspülschritt mit dem 1:1000 in Blockierlösung verdünnten Erstantikörper (*Phospho-p44/42 MAP Kinase [Thr202/Tyr204] Monoclonal* bzw. *Polyclonal Antibody* oder *Phospho-p38 MAP Kinase Monoclonal Antibody*; BioLabs, Bad Schwalbach) bei 4°C über Nacht, ebenfalls unter Schwenken, inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran einmal mit TBS-T-Waschpuffer abgespült, dann dreimal je 15 min in Waschpuffer geschwenkt und 1 h bei RT mit dem 1:3000 in Blockierlösung verdünnten Zweitanti-

körper (*anti-mouse IgG-HRP*, *anti-rabbit IgG-HRP*, *anti-mouse IgG₁-HRP*; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) unter Schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran einmal kurz und dann dreimal je 15 min in Waschpuffer gespült und in eine 1:1 Mischung der ECL-1- und ECL-2-Lösungen überführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde das ECL-Gemisch entfernt, die Membran in Folie eingeschweißt und in einer Filmkassette positioniert. Es wurden dann Filme (*Hyperfilm ECL*; Amersham, Braunschweig) 30 s, 1 min, 5 min, 10 min und 20 min exponiert.

2.4 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel

Dazu wurden die Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h bis zur Subkonfluenz gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und die nachfolgenden 24 h in FCS-freiem Medium kultiviert, um ein Wachstumsstop zu erreichen. Die Stimulation erfolgte in FCS-freiem Medium. Vor Zugabe der Stimulantien wurden die Zellen zunächst mit dem Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin, 0,1 mM; Sigma, Deisenhofen) für 10 min bei 37°C / 5% CO₂ vorinkubiert, so dass Veränderungen im zellulären cAMP-Gehalt auf eine verminderte Aktivität der Adenylatzyklase und nicht auf eine veränderte PDE-Aktivität zurückzuführen sind. (In Vorversuchen wurde gezeigt, dass diese Konzentration von 0,1 mM IBMX ausreichend ist, um einen vorzeitigen cAMP-Abbau zu verhindern.) Um die Adenylatzyklase in den Zellen zu aktivieren wurde Forskolin (1 µM; Biomol, Plymouth, USA) oder Prostaglandin E₁ (PGE₁, 5 µM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für 30 min auf die Zellen gegeben. Um den Einfluss von Thrombin (10 nM) bzw. TRAP (100 µM) auf den intrazellulären cAMP-Anstieg zu bestimmen, wurden die Zellen gleichzeitig mit Forskolin bzw. PGE₁ und Thrombin oder Forskolin bzw. PGE₁ und TRAP für 30 min bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Stimulation wurde der Zellüberstand abgenommen und bei -80°C tiefgefroren. Die Zellen wurden mit Ethanol (96%, -20°C; Sigma, Deisenhofen) fixiert, der Alkohol nachfolgend bei 37°C verdampft und Tris/EDTA-Puffer (50 mM Tris, 4 mM EDTA; pH 7,5; 1 ml pro Loch) zugegeben. Nach Schockgefrieren bei -80°C und Auftauen wurde der Puffer abgenommen und bis zur cAMP-Bestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA) eingefroren. Die Zellen wurden mit 0,1 M NaOH für die Proteinbestimmung, welche mittels Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad; München) erfolgte, lysiert.

In Vorbereitung für den RIA wurden die Proben zunächst mit Perchlorsäure in einer Endkonzentration von 5% versetzt. Anschließend wurden zu 1 ml Probe 250 µl eiskalte 2 M K_2CO_3 -Lösung gegeben und das Reaktionsende (CO_2 entweicht) abgewartet. Danach wurden die Proben für 15 min bei 5500 rpm zentrifugiert und über Nacht bei 4°C stehen gelassen, um eine vollständige Fällung des gesamten Kaliumperchlorates ($KClO_4$) zu erreichen. Nachfolgend wurden die Proben zentrifugiert, die Überstände abgenommen, der pH-Wert kontrolliert und nötigenfalls auf pH 7,4 eingestellt. 100 µl der Probe wurden für den RIA eingesetzt und dazu in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 50 µl markiertem Antigen (3H -cAMP mit 50 mM Tris/HCl, 12 mM EDTA, pH 7,5 in einer Endkonzentration von 2 ng/ml) und 50 µl Antiserum (100 mg lyophilisiertes Antiserum /900 µl aqua dest. mit defibriniertem Blutbankplasma auf eine Endkonzentration von 1:100 verdünnt) versetzt. Als Standard dienten 200 pM cAMP/10 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, ebenfalls mit 50 µl markiertem Antigen und 50 µl Antiserum versetzt. Die so angesetzten Proben wurden für mindestens 1,5 h, in der Regel jedoch über Nacht, im Kühlschrank inkubiert. Zur Trennung des gebundenen vom freien Antigen wurden die Proben mit 1 ml eiskalter Ammoniumsulfatlösung (58,5 g/150 ml aqua dest) versetzt, 5 min im Eisbad gekühlt und 2 min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert (16000g; Biofuge 13, Heraeus, Hanau).

Die Messung der Radioaktivität erfolgte entweder im Rückstand (Bestimmung der Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes), im Überstand (Bestimmung der Radioaktivität des freien Antigens) bzw. in beiden Fraktionen (Kontrolle durch Doppelmessung). Zur Bestimmung der Radioaktivität im Überstand wurden 1 ml des Überstandes abgenommen und mit Szintillationscocktail versetzt. Dabei kommt es zu einer Ausfällung von Ammoniumsulfat, die eine genaue Messung der Radioaktivität unmöglich macht. Daher müssen die Proben über Nacht im Counter belassen werden, bis sich das ausgefällte Ammoniumsulfat abgesetzt hat. Zur Bestimmung im Rückstand wurde der Überstand bis auf 50 µl abgesaugt, die Proben erneut mit 1 ml eiskalter Ammoniumsulfatlösung versetzt, 1 min geschüttelt, 5 min im Eisbad gekühlt und 2 min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert (16000g; Biofuge 13, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde wiederholt bis auf 50 µl abgesaugt, mit 1100 µl aqua dest. versetzt und bis zur völligen Auflösung geschüttelt. 1 ml der erhaltenen Lösung wurden abgenommen und mit Szintillationscocktail versetzt.

2.5 Messung der ADP-Ribosylierung von G_i-Proteinen

Die Versuche zur Messung der ADP-Ribosylierung von G_i-Proteinen aus Membranen von BCA-SMC wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Pöncke, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle durchgeführt.

Dazu wurden BCA-SMC zunächst in 6-Loch-Platten ausgesät und 48 h bis zur Subkonfluenz gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und die nachfolgenden 24 h in FCS-freiem Medium kultiviert, um ein Wachstumsstop zu erreichen. Die Stimulation erfolgte in FCS-freiem Medium. Es wurde jeweils eine 6-Loch-Platte entweder nicht stimuliert (Kontrolle) bzw. mit Thrombin (10 nM) oder TRAP (100 µM) für 24 h stimuliert. Analog wurden drei 6-Loch-Platten stimuliert, die 24 h mit Pertussis-Toxin (PTX; Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach) in einer Konzentration von 250 ng/ml vorinkubiert worden waren. Nach der Stimulation wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit D-PBS gewaschen und mittels Zellschaber abgekratzt. Die abgeschabten Zellen wurden in 250 µl D-PBS aufgenommen, in Eppendorfhütchen überführt und bei -80°C tiefgefroren. Die Proben wurden in gefrorenem Zustand nach Halle verschickt und dort wurde die ADP-Ribosylierung gemessen.

2.6 Bestimmung von bFGF in konditioniertem Medium

Um zu bestimmen, ob die Stimulation von BCA-SMC mit Thrombin bzw. TRAP einen akuten Effekt auf die zelluläre bFGF-Synthese und Freisetzung hat, wurde die Menge an bFGF-Protein im konditionierten Medium mittels eines bFGF-Immunoassay (R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt. In diesem Assay wird das bFGF der Probe zwischen einem monoklonalen Antikörper gegen humanes rekombinantes bFGF, welches an die Mikrotiterplatte gebunden ist und einem sekundären polyklonalen Antikörper gegen bFGF, welcher Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt ist, eingefangen. (Anmerkung: Nach persönlicher Mitteilung der Fa. R&D Systems ist der monoklonale Antikörper 100 % kreuzreaktiv und erkennt auch bFGF vom Rind.) Eine Auswahl an Lösungen mit bekannter bFGF-Konzentration wurde parallel analysiert, um eine Standardkurve mit der optischen Dichte der bekannten bFGF-Konzentrationen zu erhalten, aus welcher dann die unbekannten Konzentrationen abgelesen wurden. Die Farbentwicklung, deren Intensität mittels Photometer

(MAXline *Microplate Reader*; Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, Kalifornien, USA) bei 450 nm gemessen wurde, kam durch Zugabe von Wasserstoffperoxid und dem Chromogen Tetramethylbenzidin zustande.

Das konditionierte Medium von BCA-SMC wurde wie folgt erhalten: Konfluente, in 24-Loch-Platten kultivierte BCA-SMC wurden zunächst 24 h in serumfreiem Kulturmedium gehalten und anschließend für 24 h mit 10 nM Thrombin oder mit 100 μ M TRAP-6 bzw. PBS als Kontrolle inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und entweder sofort zum Assay eingesetzt oder bis dahin bei -20°C eingefroren. Die bFGF-Menge wurde dann in 100 μ l-Aliquots des zellfreien Überstands wie oben beschrieben spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen.

2.7 Messung der Plättchenaggregation

Die quantitative Bestimmung der Aggregation erfolgte mit Hilfe der von Born (1962) entwickelten turbidimetrischen Methode. Zitrat-antikoaguliertes Blut von gesunden Blutspendern wurde 10 min bei 400 g und 20°C in der Biofuge 28RS (Heraeus Instruments, Hanau) zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde abgehoben und das Blut nochmals 10 min bei 2800 g und 8°C zentrifugiert. Der Überstand (plättchenarmes Plasma = PPP) wurde erneut abgehoben. Die Plättchen im PRP wurden auf eine Zahl von 3×10^8 Plättchen/ml mittels PPP eingestellt. Von dieser Suspension wurden 170 μ l mit 20 μ l NaCl (0,9 %) gemischt und 3 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 μ l TRAP (100 μ M Endkonzentration im Versuchsansatz) wurde die Aggregation ausgelöst und die Transmissionsänderung über einen Zeitraum von 10 min im Aggregometer APACT 4 (Labor GmbH Ahrensburg) gemessen. Der Abgleich erfolgte bei diesem Versuchsablauf mit PPP.

2.8 Substanzen

2.8.1 Proteine und Peptide

Thrombin: gereinigtes bovines α -Thrombin, (Lyophilisat, 4°C); 263 IE/Flasche, Stammlösung 50 IE/ml (max. 10 Tage bei 4°C gelagert); (Feinchemie GmbH, Sebnitz)

TRAP-6-OH: SFLLRN x HCl (Lyophilisat, 4°C), C-terminal COOH-Gruppe; Stammlösung 5×10^{-3} M in D-PBS (bei -20°C gelagert); (Biosyntan, Berlin)

Bovines TRAP-6: SFLLRN x HCl (Lyophilisat, 4°C), C-terminal COOH-Gruppe; Stammlösung 5×10^{-3} M in D-PBS (bei -20°C gelagert); (Biosyntan, Berlin)

high affinity (ha)TRAP: A-(p-F)F-R-Cha-R-Y x HCl (Lyophilisat, 4°C), C-terminal Amid-Gruppe; Stammlösung 5×10^{-3} M in D-PBS (bei -20°C gelagert); (Biosyntan, Berlin)

high affinity (ha)TRAP homo-Arg: A-(p-F)F-R-Cha-hR-Y x HCl, (Lyophilisat, 4°C), C-terminal Amid-Gruppe; Stammlösung 5×10^{-3} M in D-PBS (bei -20°C gelagert); (Biosyntan, Berlin)

TRAP-14: SFLLRNPNDKYEPE x HCl (Lyophilisat, 4°C), C-terminal COOH-Gruppe; Stammlösung 5×10^{-3} M in D-PBS (bei -20°C gelagert); (Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena)

PDGF-BB: (*human recombinant homodimer*; upstate® biotechnology, Lake Placid, USA), 10 µg Lyophilisat in 10 mM Essigsäure gelöst → 10 µg/ml Stammlösung (bei -20°C gelagert)

Anti-PDGF-AB-Antikörper: (*goat polyclonal IgG*; upstate® biotechnology, Lake Placid, USA), 5 mg/ml in 0,1 M Tris-Glycin (bei -20°C gelagert)

bFGF: (25 µg/25 µl PBS; upstate® biotechnology, Lake Placid, USA)

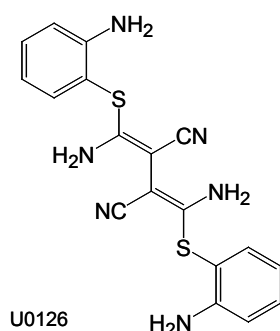
Anti-bFGF-Antikörper: (*mouse monoclonal IgG_{1κ}*, 500µg/500µl; upstate® biotechnology, Lake Placid, USA)

Anti-Phospho-MAP-Kinase-Antikörper: (*Phospho-p44/42 MAPKinase [Thr202/Tyr204] Monoclonal bzw. Polyclonal Antibody/ Phospho-p38 MAPKinase Monoclonal Antibody*; BioLabs, Bad Schwalbach)

Western-Blot-Sekundärantikörper: (*anti-mouse IgG-HRP, anti-rabbit IgG-HRP*; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

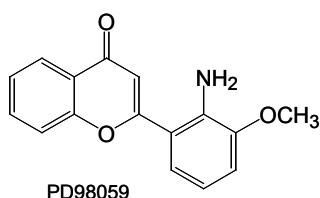
2.8.2 MAP-Kinase -Kinase (MAPKK- oder MEK)-Inhibitoren

U0126 : Stammlösung 10 mM in DMSO (bei -20°C gelagert); (Promega, Mannheim); IC_{50} = 72 nM für MEK 1 und IC_{50} = 58 nM für MEK 2 IC_{50} = 72 nM; (DeSilva et al., 1998; Favata et al., 1998)



1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien

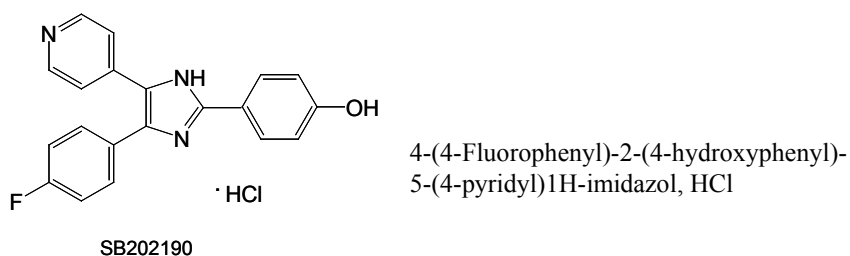
PD98059 : Stammlösung 20 mM in DMSO (bei -20°C gelagert); (RBI, Natick, USA); IC_{50} = 2 μ M; (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995; Pang et al., 1995)



2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one

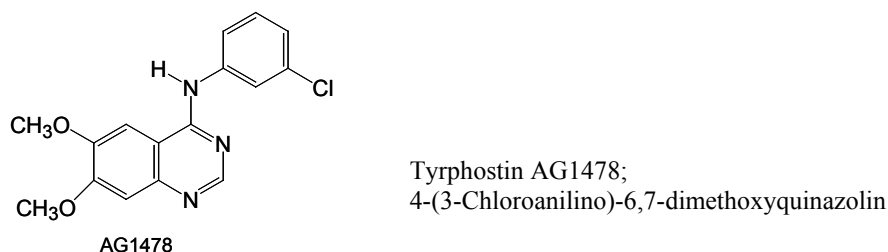
2.8.3 p38-MAPK-Inhibitor

SB202190 Hydrochlorid: wasserlösliche Form des p38-MAPK-Inhibitors SB202190, Stammlösung 5 mM in aqua bidest. (bei -20°C gelagert); (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach); IC_{50} = 350 nM; (Lee et al., 1994; Gallagher et al., 1997)



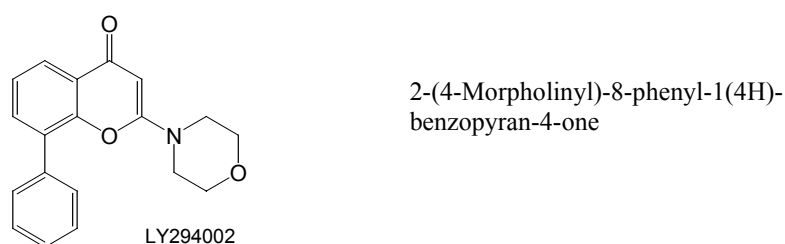
2.8.4 EGFR-Inhibitor

AG1478: Stammlösung 20 mM in DMSO (bei -20°C gelagert); (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach); IC_{50} = 3 nM; (Osherov & Levitzki, 1994; Eguchi et al., 1998)



2.8.5 PI3-Kinase-Inhibitor

LY294002: Stammlösung 30 mM in DMSO (bei -20°C gelagert); (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); IC_{50} = 1,4 μ M; (Vlahos et al., 1994; Vlahos et al., 1995; Brunn et al., 1996)



Anmerkung zu 2.7.2-2.7.5: Die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren wurden zum Teil Richtwerten aus der Literatur entnommen oder in Vorversuchen bestimmt und optimiert.

2.9 Statistik

Bei den Experimenten mit kultivierten Gefäßmuskelzellen sind die Meßdaten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten angegeben. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem zweiseitigen t-Test für gepaarte Stichproben berechnet, wobei sich die Signifikanz auf die jeweils angegebene Positiv- bzw. Negativkontrolle bezieht. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 [³H]-Thymidineinbau in SMC als Proliferationskontrolle

Die Proliferation von Zellen ist durch den Beginn der DNA-Synthese gekennzeichnet. Dieser Prozess kann durch die Messung der Aufnahme von [³H]-Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus quantitativ verfolgt werden und eignet sich daher als Methode zur Proliferationskontrolle. Glatte Muskelzellen aus Rinderkoronararterien (BCA-SMC) wurden zunächst 72 h kultiviert und dann 24 h in FCS-freiem Medium gehalten, um die Zellen damit in der G₀-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren, wo sie nur minimale Mengen an [³H]-Thymidin inkorporieren. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Agonisten stimuliert.

3.1.1 Thrombin stimuliert den [³H]-Thymidineinbau: Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Die Stimulation von SMC durch Thrombin resultierte in einem konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der [³H]-Thymidineinbaurate. Es wurden zunächst Thrombinkonzentrationen von 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM und 1000 nM eingesetzt. Abb. 6 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve nach 24-stündiger Stimulation. Der [³H]-Thymidineinbau ist in % angegeben, wobei sich die Werte auf eine nicht stimulierte Kontrolle beziehen. Proportional zur eingesetzten Thrombinkonzentration stieg die Einbaurate von [³H]-Thymidin. Das zeigt, dass Thrombin in Abhängigkeit von der Konzentration einen mitogenen Effekt auf BCA-SMC ausübt. Untersuchungen zur zeitlichen Kinetik des Thymidineinbaus ergaben, dass nach Thrombinstimulation das Maximum des [³H]-Thymidineinbaus nach 24 h erreicht wurde. Nach 12 h zeigte sich der Beginn einer signifikanten Steigerung im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch war nach 48-stündiger Stimulation wieder eine basale [³H]-Thymidineinbaurate erreicht. Für alle weiteren Versuche wurde als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Stimulation und zum Überprüfen der Stimulierbarkeit der Zellen jeweils ein Ansatz mitgeführt, in dem die Zellen mit 10 nM Thrombin stimuliert wurden, da dies als halbmaximale Konzentration ermittelt wurde. Dieser Wert wurde dann zum Vergleich für die Wirksamkeit der anderen verwendeten Stimulantien herangezogen.

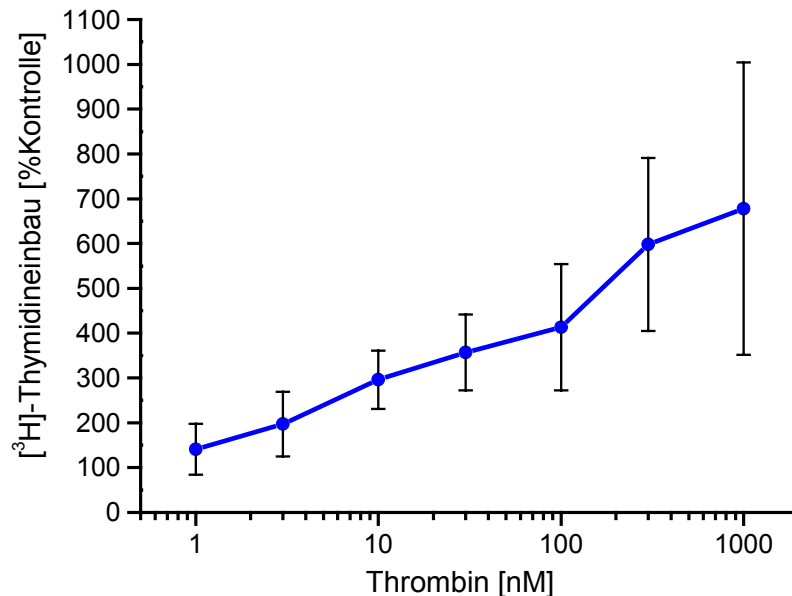


Abb. 6: Konzentrations-Wirkungskurve für den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau. Mittelwerte \pm SEM aus 11 verschiedenen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmungen, mit zwei BCA-SMC-Zelllinien. Die Zellen waren 24 h mit Thrombin stimuliert worden.

3.1.2 Effekte von Thrombin und TRAP auf den [³H]-Thymidineinbau in BCA-SMC

Synthetische Peptide, die dem neuen Aminoterminus des gespaltenen Thrombinrezeptors entsprechen, können ebenfalls an den Rezeptor binden und einige der Thrombineffekte nachahmen. Sie werden daher als Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide (TRAP) bezeichnet. Im Vergleich zum Thrombin wurden verschiedene TRAP untersucht. Das haTRAP, als *high affinity* TRAP bezeichnet (Feng et al., 1995), zeigte in Untersuchungen an Blutplättchen eine 100fach stärkere aggregationsauslösende Wirkung als die anderen Rezeptorpeptide. An isolierten Gefäßpräparaten von der Arteria pulmonalis vom Schwein waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptorpeptiden nachzuweisen (Glusa, 1999). Um Speziesunterschiede als Ursache für die fehlende mitogene Wirkung der Rezeptorpeptide auszuschalten wurde das bovine TRAP geprüft. Außerdem wurden zwei unterschiedlich lange Peptide, die dem neuen Aminoterminus des gespaltenen humanen PAR-1 entsprechen, verwendet. Die Stimulation der SMC mit Thrombin (10 nM) resultierte in einem Anstieg des [³H]-Thymidineinbaus auf 252 ± 12 % verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Abb. 7). Dagegen konnte durch Stimulation mit den Rezeptorpeptiden in

einer Konzentration von 100 μM keine signifikante Steigerung des [^3H]-Thymidineinbaus erreicht werden. Um einen Aktivitätsverlust der TRAP als Ursache für die Wirkungslosigkeit auf die [^3H]-Thymidineinbaurate auszuschließen, wurde mittels Plättchenaggregationstest gezeigt, dass TRAP auch nach einer 24-stündigen Inkubationsphase im Kulturmedium noch voll aktiv ist, da TRAP-haltiges Kulturmedium in der Lage ist, Thrombozyten in gleichem Ausmaß zu aggregieren, wie eine frisch hergestellte TRAP-Lösung gleicher Konzentration. Daher kann ein Abbau von TRAP durch zellständige Peptidasen während der Inkubationszeiten ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen zur zeitlichen Kinetik des Thymidineinbaus wurden ebenfalls mit TRAP-6 durchgeführt. Es wurde nachgewiesen, dass weder nach 12-stündiger noch nach 48-stündiger Stimulation mit TRAP-6 ein signifikanter [^3H]-Thymidineinbau in die SMC erfolgte. Das heißt, im Vergleich zum Thrombin ist auch eine zeitliche Verschiebung der mitogenen Wirkung auszuschließen.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlussfolgert, dass die verschiedenen TRAP keinen mitogenen Effekt auf BCA-SMC ausüben.

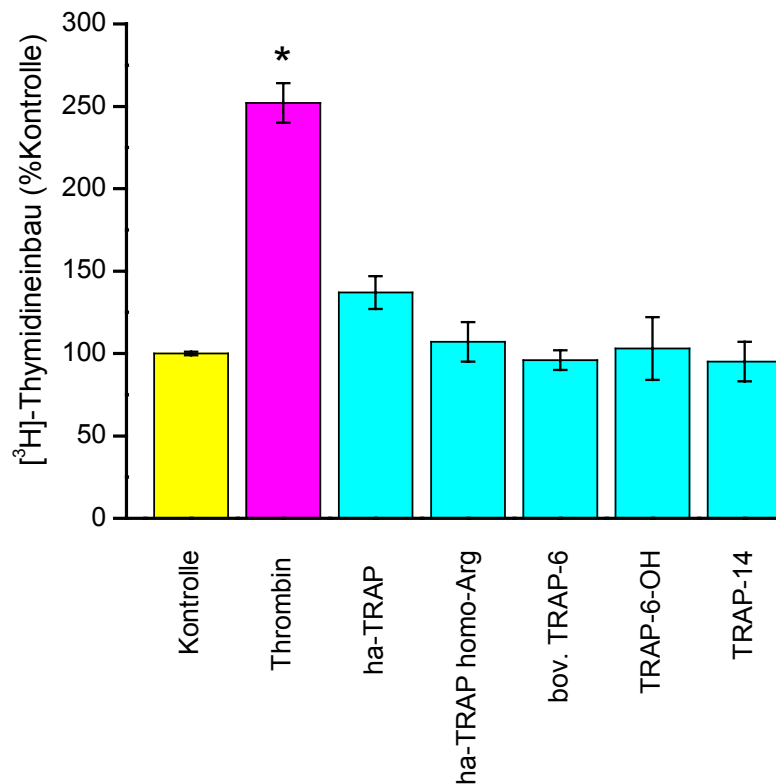


Abb. 7: Einfluss verschiedener TRAP auf den [³H]-Thymidineinbau in SMC verglichen mit Thrombin (10 nM) und nicht stimulierten Zellen (Kontrolle) nach 24-stündiger Stimulation. Die TRAP wurden in einer Konzentration von 100 µM verwendet. Daten sind Mittelwerte ± SEM von n = 2-5 separaten Experimenten. * p < 0,05 (bezogen auf Kontrolle).

3.1.3 Ist PAR-4 als weiterer Thrombinrezeptor an der Thrombin-induzierten DNA-Synthese beteiligt?

Da inzwischen vier Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) bekannt sind (PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4) (Vu et al., 1991a; Nystedt et al., 1994; Ishihara et al., 1997; Xu et al., 1998), besteht die Möglichkeit, dass noch ein weiterer Thrombinrezeptor an der Thrombin-induzierten DNA-Synthese beteiligt ist. PAR-2 wird nicht durch Thrombin, sondern durch Trypsin aktiviert und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Außer PAR-1 kann auch PAR-4 durch synthetische Peptide, deren Sequenzen denen der neugebildeten Aminotermini der Rezeptoren entsprechen, aktiviert werden. Für PAR-3 wurde solch ein Peptid nicht gefunden (Kawabata et al., 2000). Diese Tatsache wurde genutzt, um zu überprüfen, ob

PAR-4 an der Thrombin-induzierten Mitogenese in BCA-SMC mit beteiligt ist, da kürzlich von Bretschneider et al. (2001) beschrieben wurde, dass PAR-4 in humanen Gefäßmuskelzellen funktionell aktiv ist. Das synthetische Peptid GYPGQV fungiert als Agonist für PAR-4, wird aber in Konzentrationen von 200-500 μM benötigt. In Strukturaktivitätsanalysen von PAR-4-Peptiden zeigten Faruqi et al. (2000), dass das Peptid AYPGKF zehnfach wirksamer als GYPGQV ist, und im Gegensatz zu diesem eine PAR-4-vermittelte Reaktion in der Stärke wie Thrombin auslösen kann. Deshalb wurde das Peptid AYPGKF verwendet und geprüft, ob es einen Einfluss auf die Thrombin-induzierte [^3H]-Thymidineinbaurate ausübt. In den Konzentrationen 100 μM und 500 μM steigerte das Peptid die Einbaurate nicht, auch nicht nach gemeinsamer Gabe mit dem PAR-1 Peptid TRAP-6 (100 μM) (Abb. 8). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass BCA-SMC wahrscheinlich keinen funktionell aktiven PAR-4 besitzen.

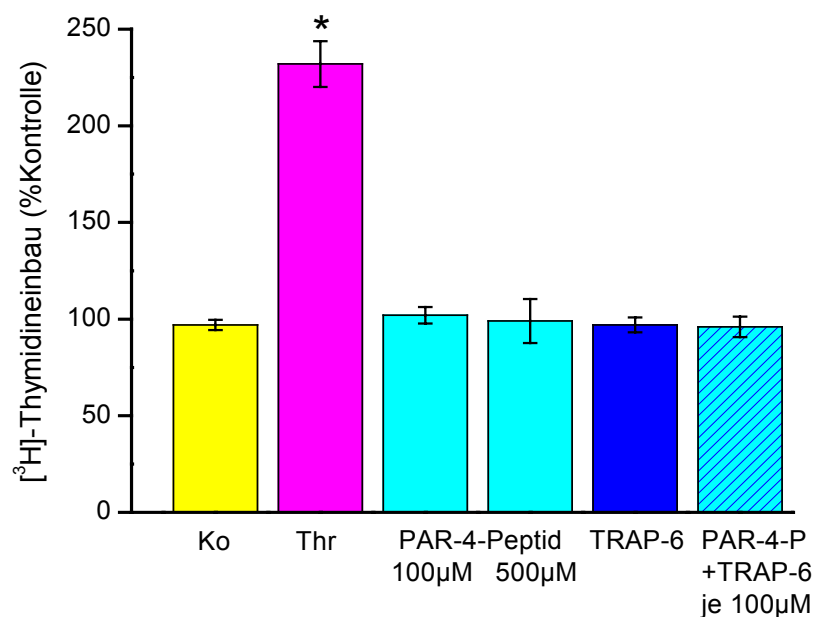


Abb. 8: [^3H]-Thymidineinbau in SMC induziert durch Thrombin (Thr; 10 nM), TRAP-6 (100 μM) und PAR-4-Peptid verglichen mit nicht stimulierten Zellen (Kontrolle, Ko) nach 24-stündiger Stimulation. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ separaten Experimenten mit zwei verschiedenen Zelllinien. * $p < 0,05$ bezogen auf Kontrolle.

3.1.4 Effekte eines p38-MAPK-Inhibitors auf den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau

Um zu untersuchen, welche Signaltransduktionswege an der mitogenen Thrombinwirkung beteiligt sind, wurde zunächst überprüft, ob die Hemmung der p38-MAPK einen Einfluss auf den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau ausübt. Dazu wurden die BCA-SMC 1 h vor Stimulation mit 10 nM Thrombin mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB202190 in verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert. Zunächst wurde der Inhibitor in den Konzentrationen 10 µM, 30 µM und 100 µM getestet, wobei jeweils ein Ansatz pro Konzentration mitgeführt wurde, in dem nur der Inhibitor zu den Zellen gegeben worden war, um eine eventuelle Eigenwirkung - entweder des Inhibitors oder des verwendeten Lösungsmittels (DMSO) - erkennen zu können. Es wurden auch Kontrollen durchgeführt, in denen nur das Lösungsmittel DMSO zu den Zellen gegeben wurde. DMSO (in Konzentrationen bis 0,1 %) zeigte keinen Einfluss auf den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau.

Bei Konzentrationen ab 30 µM wurde bereits ein erheblicher Eigeneffekt des Inhibitors festgestellt, der den [³H]-Thymidineinbau auf eine kaum noch meßbare Rate reduzierte. Es wurde festgestellt, dass sich die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 30 µM SB202190 abgekugelt hatten und abgelöst im Medium schwammen, weshalb von toxischen Einflüssen dieser Substanz (in entsprechend hohen Konzentrationen) auf die Zellen ausgegangen wird (Abb. 9).

Überraschenderweise konnte in den mit 5 µM SB202190 behandelten Proben ein signifikant erhöhter [³H]-Thymidineinbau von 182 % im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen (Kontrolle) gemessen werden. Das lässt vermuten, dass die Substanz SB202190 in einer Konzentration von 5 µM einen stimulierenden Einfluss auf die Zellen ausübt. Dieser Effekt ließ sich auch in einer Konzentration von 1 µM noch nachweisen. Aus diesen Versuchen lässt sich keine Aussage treffen, ob die Hemmung der p38-MAPK durch SB202190 die mitogene Thrombinwirkung beeinflusst.

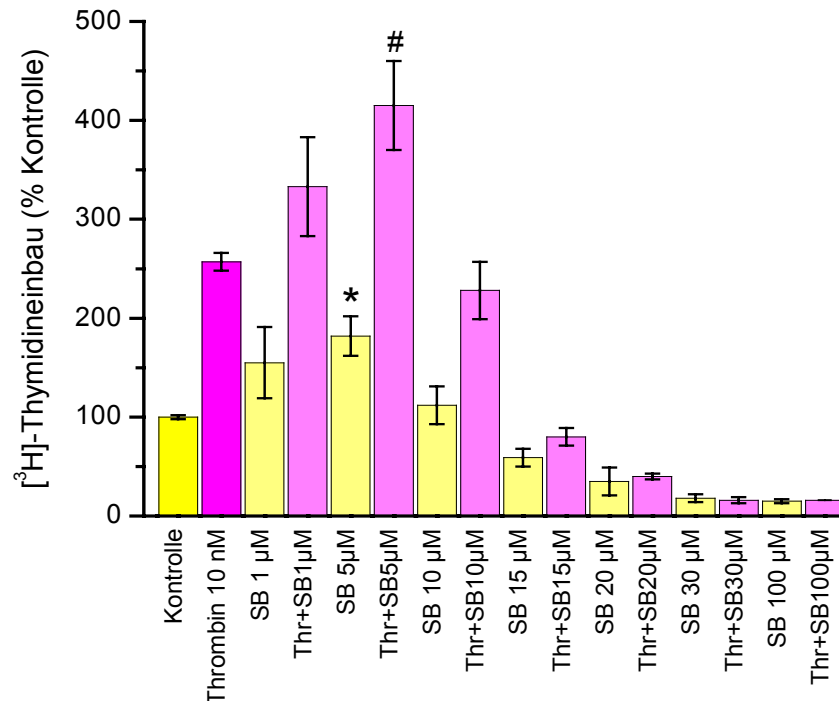


Abb. 9: Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors SB202190 auf den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau, verglichen mit nicht stimulierten Zellen (Kontrolle). Die Zellen waren 1 h vor der 24-stündigen Stimulation mit Thrombin (Thr) mit dem Inhibitor vorinkubiert worden. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n = 3-5 unabhängigen Experimenten mit drei verschiedenen Zelllinien. * p < 0,05 bezogen auf Kontrolle, # p < 0,05 bezogen auf Thrombinstimulation.

3.1.5 Einfluss eines PDGF-Antikörpers auf den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau

In der Literatur ist beschrieben, dass etwa 30 % der mitogenen Thrombinwirkung an SMC der Ratten-Aorta über PDGF, welches durch Thrombin freigesetzt wird, zustande kommen (Stouffer et al., 1993). Es sollte überprüft werden, ob sich diese Aussage bei BCA-SMC bestätigen lässt. Dazu wurde ein Antikörper gegen PDGF eingesetzt, der die PDGF-Isoformen PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB neutralisieren kann. Als Negativkontrollen galten nichtbehandelte Zellen (Kontrolle) und Zellen, die mit dem Antikörper (10 µg/ml) alleine inkubiert worden waren. Die Stimulation mit Thrombin (10 nM) oder PDGF-BB (5 ng/ml) wies auf eine normale Stimulierbarkeit der Zellen hin (Anstieg des

[³H]-Thymidineinbau auf 221 % bzw. 175 %). Die neutralisierende Wirkung des Antikörpers zeigte sich darin, dass die stimulierende Wirkung von PDGF-BB (5 ng/ml) vollständig aufgehoben wurde. Die 30-minütige Vorbehandlung der SMC mit dem anti-PDGF-AK (10 µg/ml) vor der Stimulation mit Thrombin (10 nM) hatte keinen Einfluss auf den [³H]-Thymidineinbau (Abb. 10).

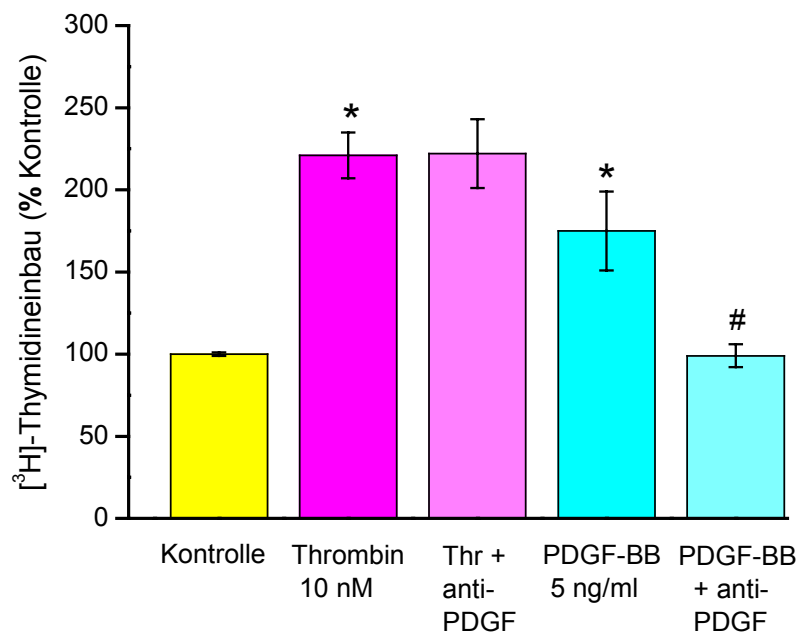


Abb. 10: [³H]-Thymidineinbau (in % Kontrolle) nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml anti-PDGF-AK vor der Stimulation mit Thrombin (Thr; 10 nM) oder PDGF-BB (5 ng/ml). Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit zwei unterschiedlichen Zelllinien. * p < 0,05 bezogen auf Kontrolle, # p < 0,05 bezogen auf PDGF-Stimulation.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist PDGF als autokriner Wachstumsfaktor beim Thrombin-induzierten mitogenen Effekt in BCA-SMC auszuschließen.

3.2 Effekte von Thrombin und TRAP auf die Phosphorylierung der p44/42-MAP-Kinase in glatten Muskelzellen

Die Aktivierung der MAPK ist ein entscheidender Schritt für die zelluläre Proliferation (Payne et al., 1991). Voraussetzung für diese Aktivierung ist die Phosphorylierung der MAPK an einem Threonin- und einem Tyrosin-Rest, welche durch einen Glutaminsäurerest getrennt werden. Um die Aktivität von endogenen MAPK als Antwort auf GPCR-Liganden zu bestimmen, ist daher die Verwendung von anti-phospho-MAPK-spezifischen Antikörpern eine geeignete Methode. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass die p42-MAPK in BCA-SMC die vorherrschende MAPK-Isoform darstellt (Skaletz-Rorowski et al., 1999).

Sowohl Thrombin (10 nM) als auch TRAP (100 μ M) bewirkten eine zeitabhängige Aktivierung der p44/42-MAPK in BCA-SMC, wie im Western Blot gezeigt wurde (Abb. 11). TRAP stimulierte die p44/42-MAPK schwächer als Thrombin. Das Aktivierungsmaximum durch Thrombin erschien nach 20 min, das durch TRAP bereits nach 10 min. Danach fiel die MAP-Kinase-Aktivität kontinuierlich ab. Auch bei einer Stimulationsdauer bis zu 24 h stieg die Aktivität nicht erneut an. In Abb. 11 ist der Verlauf der p44/42-MAPK-Aktivierung in einem Zeitraum von 5 min bis 240 min gezeigt. Die Zellen waren entweder mit Thrombin oder mit TRAP für jeweils 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min und 240 min stimuliert worden. Als Vergleich dienten nicht stimulierte Zellen (0 = Kontrolle). Dieser Versuch wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen die phosphorylierten und damit aktivierten p44/42-MAPK durchgeführt.

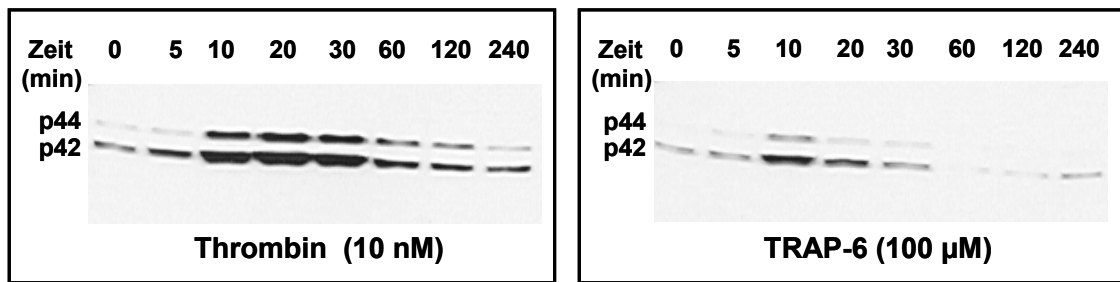


Abb. 11: Zeitabhängige Stimulation der p44/42-MAPK durch Thrombin (10 nM) und TRAP-6 (100 µM) nachgewiesen mittels Western Blot. Die Zellen waren stimuliert und anschließend lysiert worden. Die Zellysate wurden auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem ECL-Kit sichtbar gemacht. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurde aus der Wanderungsstrecke von Standard-Proteinen abgeschätzt. Der Film wurde für 10 min exponiert. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für sechs unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

3.3 Einfluss der MAPKK (MEK)-Inhibitoren PD98059 und U0126 auf die Thrombin-induzierte DNA-Synthese und die p44/42-MAPK-Phosphorylierung durch Thrombin und TRAP

Da die p44/42-MAPK eine wichtige Schaltstelle in der Signaltransduktion bei der Mitogenese sind (Payne et al., 1991), wurde dieser Signaltransduktionsweg beispielhaft untersucht. Es wurde geprüft, ob die p44/42-MAPK durch die MAPK-Kinase (MEK) reguliert wird. Da dieser regulatorische Weg bereits für viele verschiedene Zelltypen gezeigt werden konnte (Widmann et al., 1999), wurde angenommen, dass die p44/42-MAPK-Aktivierung durch Thrombin in BCA-SMC ebenfalls durch die MEK erfolgt. Daher wurden die zell-permeablen MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 eingesetzt, um diese Annahme zu bestätigen. Wenn also, wie angenommen, die MEK in der Signaltransduktionskaskade der p44/42-MAPK vorgeschaltet ist, so stellt deren Hemmung eine Möglichkeit dar, die Beteiligung dieses Signalweges am Thrombin-induzierten mitogenen Effekt und dadurch erhöhten [³H]-Thymidineinbau zu untersuchen. Zunächst wurde der Einfluss des Inhibitors PD98059 getestet. Die Spezifität von PD98059 wurde durch Alessi et al. (1995) sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt.

PD98059 wurde in Konzentrationen von 0,3 μM , 1 μM und 3 μM 1 h vor Stimulation der Zellen mit Thrombin (10 nM) zugegeben. Die Ergebnisse für den [^3H]-Thymidineinbau sind in Abb. 12 gezeigt.

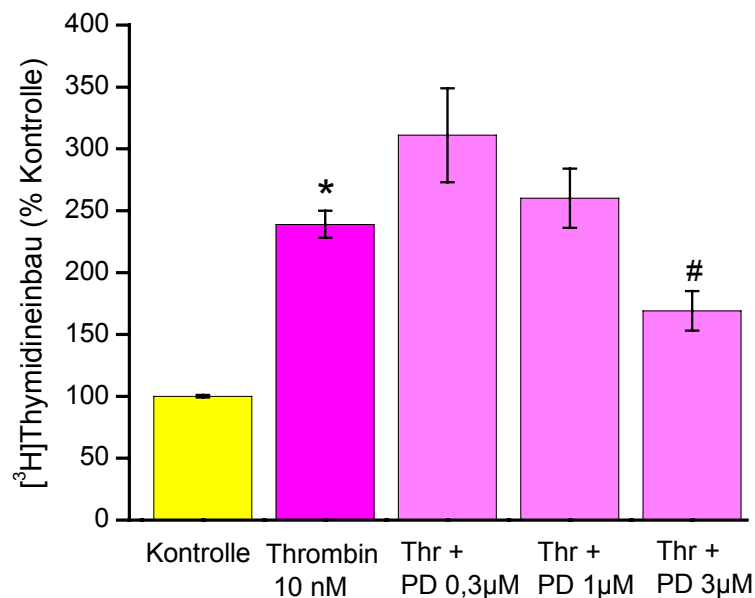


Abb. 12: Thrombin-induzierter [^3H]-Thymidineinbau (in % Kontrolle) nach Hemmung mit verschiedenen Konzentrationen des MEK-Inhibitors PD98059. Die Zellen waren 1 h vor Stimulation mit Thrombin (Thr; 10 nM) mit dem Inhibitor vorinkubiert worden. Mittelwerte \pm SEM aus fünf verschiedenen Experimenten mit vier unterschiedlichen Zelllinien. * $p < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle; # $p < 0,05$ bezogen auf Thrombinstimulation.

Auch hier konnte ein leicht stimulierender Effekt der niedrigen Konzentrationen (0,3 μM und 1 μM) festgestellt werden. Nur bei einer Konzentration von 3 μM wurde die [^3H]-Thymidineinbaurate von 240 %, die durch Thrombin (10 nM) ausgelöst wurde, auf 169 % signifikant vermindert ($p < 0,05$).

Der MEK-Inhibitor U0126 ist stärker wirksam, hat einen niedrigeren IC_{50} -Wert als PD98059 und ist in Zellkultur weniger toxisch. Er wurde daher zusätzlich mit in die Untersuchungen einbezogen. Die einstündige Vorbehandlung der SMC mit U0126, ebenfalls in den Konzentrationen 0,3 μM , 1 μM und 3 μM , verursachte eine Abnahme des Thrombin-induzierten [^3H]-Thymidineinbaus, wobei mit zunehmender Konzentration von U0126 eine

abnehmende Einbaurrate gemessen wurde (Abb. 13). Dies zeigt, dass die p44/42-MAPK-Kaskade an der mitogenen Wirkung des Thrombins beteiligt ist.

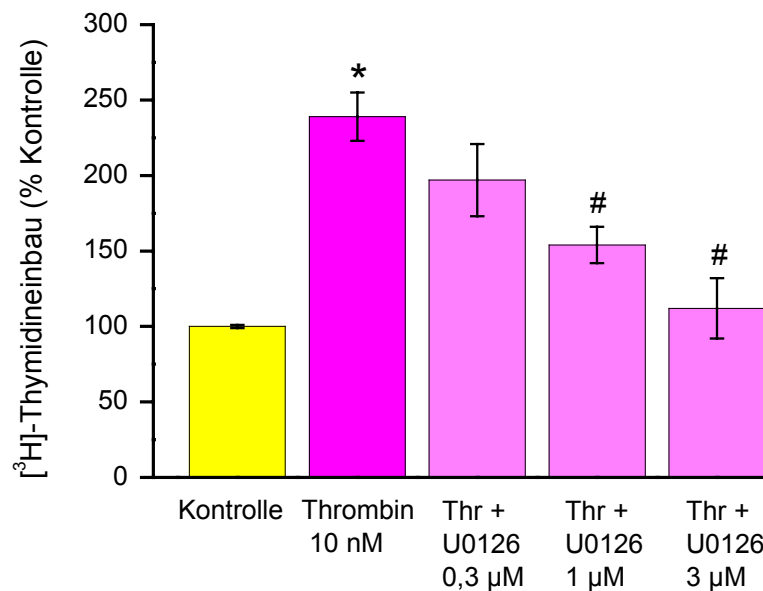


Abb. 13: Thrombin-induzierter [³H]-Thymidineinbau (in % Kontrolle) nach Hemmung mit verschiedenen Konzentrationen des MEK-Inhibitors U0126. Die Zellen waren 1 h vor Stimulation mit Thrombin (Thr; 10 nM) mit dem Inhibitor vorinkubiert worden. Mittelwerte \pm SEM aus sechs unabhängigen Experimenten mit vier unterschiedlichen Zelllinien. * $p < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle; # $p < 0,05$ bezogen auf Thrombinstimulation.

Auch mittels Western Blot wurde untersucht, ob die p44/42-MAPK durch die MAPK-Kinase (MEK) reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombin- bzw. TRAP-induzierte p44/42-MAPK-Phosphorylierung durch einstündige Vorbehandlung der Zellen mit dem MAPKK-Inhibitor PD98059 in einer Konzentration von 3 μ M vermindert wurde (Abb. 14). PD98059 hemmte signifikant die Thrombin-bedingte Aktivierung der MAPK nach 20 min und 30 min und die durch TRAP induzierte MAPK-Aktivierung nach 10 min und 20 min.

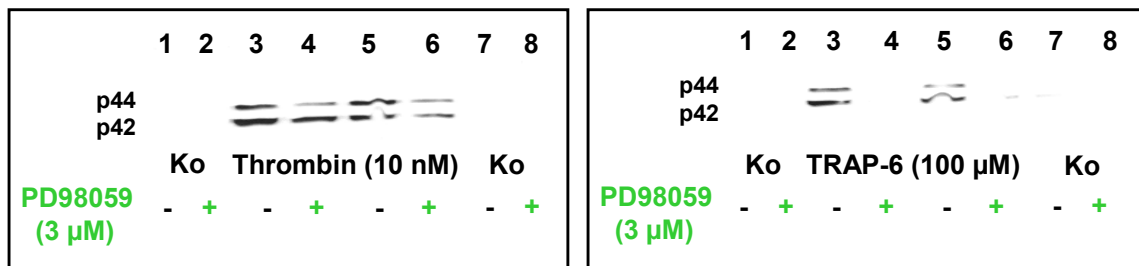


Abb. 14: Zeitabhängige Stimulation der p44/42-MAPK durch Thrombin (10 nM) und TRAP-6 (100 μM) und Hemmung durch PD98059 (3 μM). Der Inhibitor war 1 h vor Stimulation auf die Zellen gegeben worden. links: Spur 1: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle), Spur 2: nicht-stimuliert, aber mit PD vorbehandelt, Spur 3: 20 min stimuliert, Spur 4: 20 min stimuliert u. mit PD vorbehandelt, Spur 5: 30 min stimuliert, Spur 6: 30 min stimuliert u. mit PD vorbehandelt, Spur 7: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle), Spur 8: nicht-stimuliert, aber mit PD vorbehandelt.

rechts: Spur 1: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle), Spur 2: nicht-stimuliert, aber mit PD vorbehandelt, Spur 3: 10 min stimuliert, Spur 4: 10 min stimuliert u. mit PD vorbehandelt, Spur 5: 20 min stimuliert, Spur 6: 20 min stimuliert u. mit PD vorbehandelt, Spur 7: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle), Spur 8: nicht-stimuliert, aber mit PD vorbehandelt. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

Ebenfalls wurde sowohl die Thrombin- als auch die TRAP-induzierte MAPK-Aktivierung vollständig durch den MAPKK-Inhibitor U0126 blockiert (Abb. 15). Das heißt, dass weder Thrombin noch TRAP die p44/42-MAPK-Phosphorylierung in U0126-behandelten Zellen stimulieren konnten. Diese Experimente zeigen, dass die MAPK-Aktivierung über die MEK erfolgt. Weiterhin kann aus diesen Ergebnissen festgestellt werden, dass für die mitogene Wirkung eine Aktivierung der p44/42 MAPK zwar essentiell, aber nicht allein ausreichend ist, da dieser Schritt der Signalkaskade sowohl bei Thrombin als auch bei TRAP gleich ist, aber nur durch Thrombin ein [³H]-Thymidineinbau bewirkt wird.

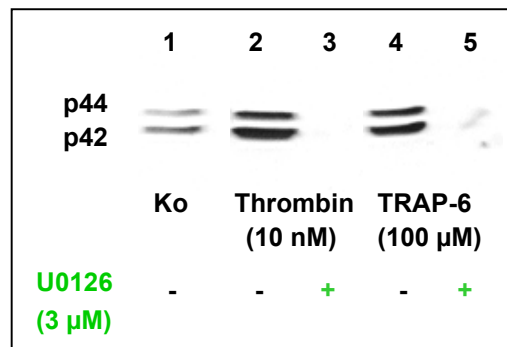


Abb. 15: Hemmung der Thrombin- bzw. TRAP-6-induzierten p44/42-MAPK-Aktivierung durch den MAPKK-Inhibitor U0126 (3 μM). Der Inhibitor war 1 h vor Stimulation mit 10 nM Thrombin bzw. 100 μM TRAP-6 auf die Zellen gegeben worden. Spur 1: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle), Spur 2: 20 min Thrombin-stimuliert, Spur 3: U0126 vorbehandelt und 20 min Thrombin-stimuliert, Spur 4: 10 min TRAP-6-stimuliert, Spur 5: U0126 vorbehandelt und 10 min TRAP-6-stimuliert. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

3.4 Einfluss eines bFGF-Antikörpers auf den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau und die Thrombin- bzw. TRAP-vermittelte p44/42-MAPK-Phosphorylierung

Nachdem eine eventuelle PDGF-Beteiligung an der mitogenen Wirkung des Thrombins ausgeschlossen wurde, untersuchten wir, ob als weiteres endogenes Mitogen in BCA-SMC der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) in Betracht kommt. Deshalb wurden die Zellen vor der Stimulation 30 min mit einem neutralisierenden Antikörper gegen bFGF vorinkubiert und danach der Thrombin-induzierte Thymidineinbau gemessen (Abb. 16A), bzw. die MAPK-Phosphorylierung mittels Western Blot bestimmt (Abb. 16B). Als Positivkontrolle wurde bei beiden Versuchen ein bFGF-stimulierter Ansatz mitgeführt.

Der Antikörper hemmte erwartungsgemäß den bFGF-induzierten Thymidineinbau. Es zeigte sich auch eine signifikante Hemmung der Thrombin-induzierten Thymidineinbaureate durch diesen Antikörper. Daher wurde angenommen, dass endogen freigesetzter bFGF am mitogenen Effekt des Thrombins beteiligt ist.

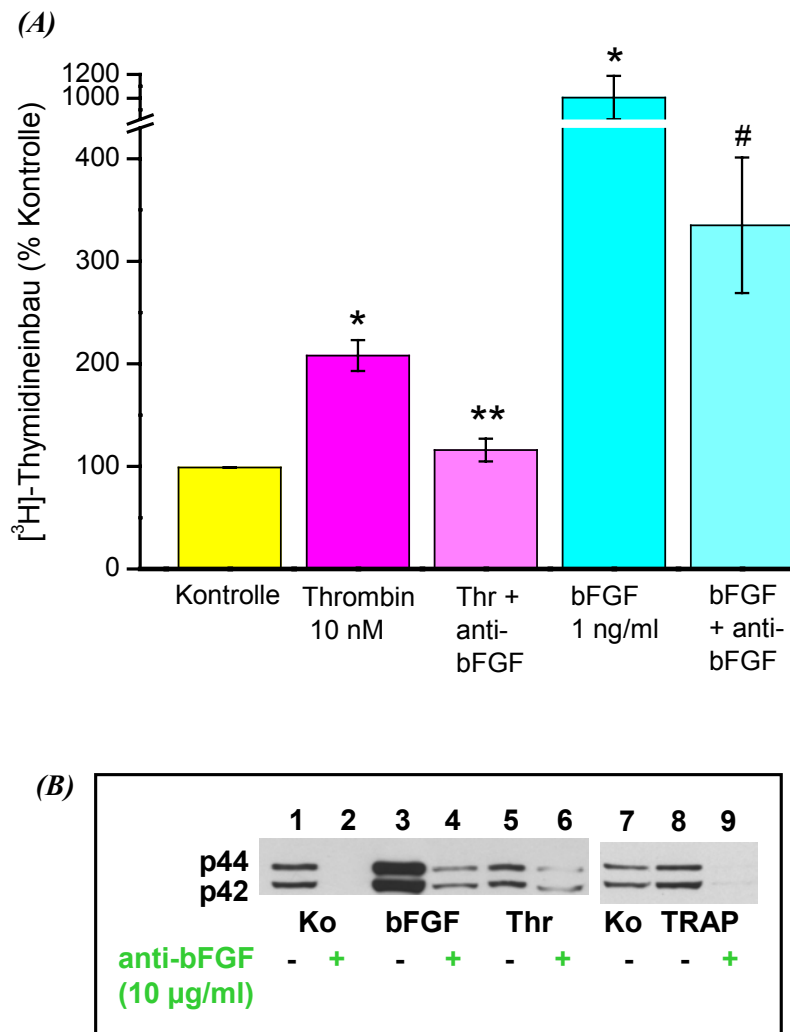


Abb. 16: Einfluss eines anti-bFGF-Antikörpers auf DNA-Synthese und p44/42-MAPK-Phosphorylierung nach 30-minütiger Vorinkubation der Zellen mit 10 µg/ml anti-bFGF-AK vor Stimulation mit Thrombin (Thr; 10 nM), bFGF (1 ng/ml) bzw. TRAP-6 (100 µM). **(A)** [³H]-Thymidineinbaurate verglichen mit nicht stimulierten Zellen (Kontrolle) nach 24-stündiger Stimulation. Daten sind Mittelwerte ± SEM aus sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Zelllinien. * $p < 0,05$ bezogen auf Kontrolle, ** $p < 0,05$ bezogen auf Thrombinstimulation, # $p < 0,05$ bezogen auf bFGF-Stimulation. **(B)** p44/42-MAPK-Aktivierung nach Thrombinstimulation (20 min), bFGF-Stimulation (10 min) bzw. TRAP-6-Stimulation (10 min). Spur 1: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle), Spur 2: AK vorbehandelt, Spur 3: bFGF-stimuliert, Spur 4: AK vorbehandelt und bFGF-stimuliert, Spur 5: Thrombin-stimuliert, Spur 6: AK vorbehandelt und Thrombin-stimuliert, Spur 7: Kontrolle, Spur 8: TRAP-6-stimuliert, Spur 9: AK vorbehandelt und TRAP-6-stimuliert. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

Auch mittels Western Blot wurde ein hemmender Einfluss des anti-bFGF-Antikörpers nachgewiesen. Allerdings wird nicht nur die Thrombin-, TRAP- oder bFGF-induzierte MAPK-Phosphorylierung abgeschwächt, sondern auch die basale MAPK-Phosphorylierung. Dies spricht für eine grundsätzliche bFGF-Beteiligung, die höchstens noch durch Thrombin- bzw. TRAP verstärkt werden könnte.

Da nach den vorliegenden Untersuchungen bFGF an der Thrombin-induzierten Mitogenese beteiligt sein kann, wurden in diesem Zusammenhang Experimente mit konditioniertem Medium von stimulierten BCA-SMC durchgeführt. Dazu waren zunächst Zellen mit Thrombin (10 nM) oder TRAP-6 (100 μ M) für 24 h stimuliert worden. Das Medium von diesen Zellen, welches nun als "konditioniertes Medium" (CM) bezeichnet wird, wurde anschließend auf unstimulierte Zellen, wiederum für 24 h, gegeben und nachfolgend die [3 H]-Thymidineinbaurate gemessen. Als Vergleichswerte für die Wirkung dieses konditionierten Mediums wurde Medium von nicht stimulierten Zellen auf unstimulierte Zellen gegeben. Alle Werte beziehen sich auf eine nicht stimulierte Kontrolle (Abb. 17).

Es wurde festgestellt, dass bereits das konditionierte Medium von nicht stimulierten Kontrollzellen eine erhebliche Steigerung der [3 H]-Thymidineinbaurate hervorrief. Ebenso stark war die Wirkung von TRAP-6-konditioniertem Medium. CM von Thrombin-stimulierten Zellen stimulierte wesentlich stärker, wobei dieser Effekt durch Hirudin (10 ATE/ml) stark gehemmt wurde. Dies zeigt eine Wirkung von noch vorhandenem aktiven Thrombin an. Eine noch stärkere Hemmung wurde durch gemeinsame Vorinkubation von Hirudin und einem neutralisierenden anti-bFGF-Antikörper vor Zugabe von Thrombin-CM erreicht.

Diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, dass bereits eine basale bFGF-Produktion der Zellen, unabhängig von einer Stimulation, stattfindet. Thrombin ist, im Gegensatz zu TRAP, in der Lage, den Effekt vom ohnehin produzierten bFGF zu potenzieren (Bretschneider et al., 1997) und bewirkt wahrscheinlich keine zusätzliche bFGF-Freisetzung.

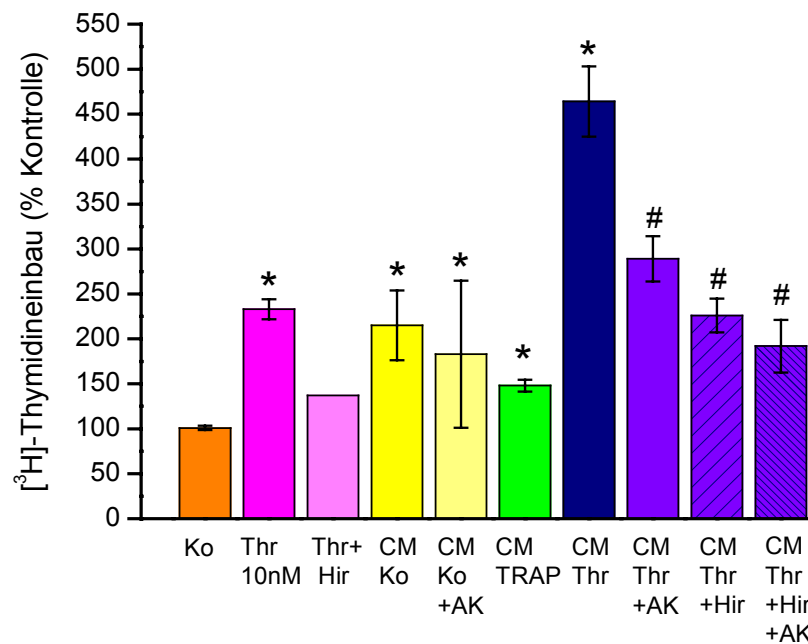


Abb. 17: [³H]-Thymidineinbau (in % Kontrolle) nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit konditioniertem Medium (CM) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Ko) und Thrombinstimulation (Thr). Hirudin (Hir; 10 ATE/ml) wurde 30 min vor der Stimulation zugegeben. Mittelwerte \pm SEM aus sechs unabhängigen Experimenten mit drei unterschiedlichen Zelllinien. * $p < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle; # $p < 0,05$ bezogen auf CM Thr.

Um eindeutig zu klären, ob durch Thrombin oder eventuell auch durch TRAP eine bFGF-Freisetzung bewirkt wird, wurden die Zellen zunächst wieder 24 h mit Thrombin (10 nM) bzw. TRAP-6 (100 μ M) oder PBS als Kontrolle stimuliert und anschließend im so konditionierten Medium die Konzentration von bFGF mittels ELISA bestimmt. Die Meßwerte lagen allesamt im Bereich zwischen 0 und 10 pg/ml. Das bedeutet, dass keine nennenswerte bFGF-Freisetzung ins Medium erfolgte.

3.5 Effekte des spezifischen EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 auf den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau und die Thrombin- bzw. TRAP-vermittelte p44/42-MAPK-Phosphorylierung

Der mitogene Effekt des Thrombins könnte auch über den EGF-Rezeptor (EGF-R) vermittelt werden. Dieser Prozess wird als Transaktivierung beschrieben (Daub et al., 1996). Auch neuere Erkenntnisse belegen, dass Thrombin in SMC über eine Transaktivierung des EGF-R mitogen wirkt (Kanda et al., 2001a), die möglicherweise durch den *heparin binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) vermittelt wird (Kalmes et al., 2000; Prenzel et al., 1999). Daher sollte überprüft werden, ob dieser Zusammenhang auch bei BCA-SMC nachgewiesen werden kann. Zur Ausschaltung des EGF-R wurde ein spezifischer Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase, das AG1478 (Oshero & Levitzki, 1994), genutzt. Zunächst wurde dessen Einfluss auf den Thrombin-induzierten [³H]-Thymidineinbau untersucht. Wie Abb. 18 zeigt, hemmte AG1478 die DNA-Synthese nicht konzentrationsabhängig. In Konzentrationen ab 10 µM zeigte die Substanz in den Kontrollansätzen ohne Thrombinzugabe eine derartig starke Reduktion der [³H]-Thymidineinbaurate, so dass ein toxischer Effekt zu vermuten ist und man von einer unspezifischen Wirkung ausgehen kann. Der stimulierende Effekt von EGF (10 ng/ml) wurde dagegen vollständig durch AG1478 (2 µM) aufgehoben, was als Positivkontrolle für die Wirkung des Inhibitors anzusehen ist.

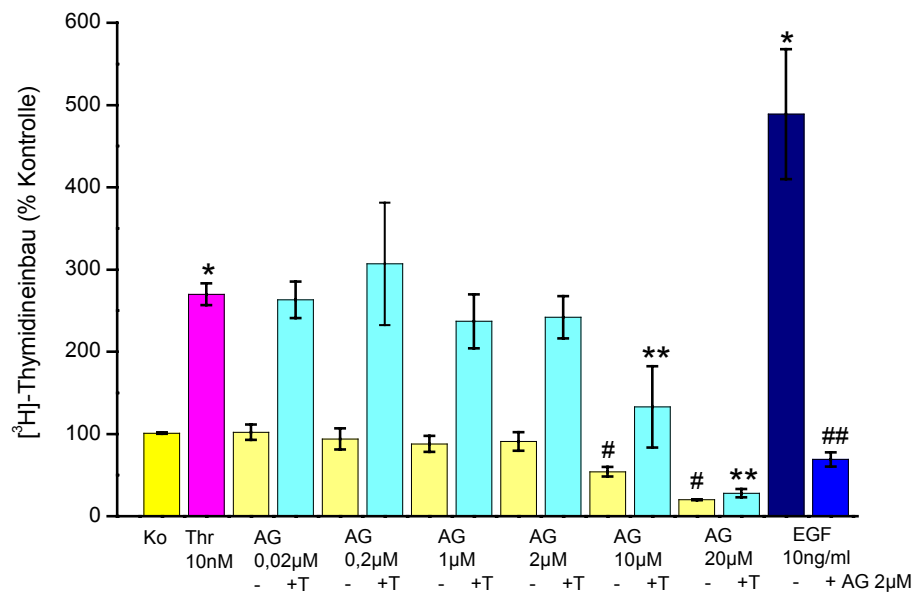


Abb. 18: Einfluss des EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 auf den Thrombin-induzierten [^3H]-Thymidineinbau, verglichen mit nicht stimulierten Zellen (Kontrolle, Ko). Die Zellen waren 1 h vor der 24-stündigen Stimulation mit Thrombin (Thr; 10 nM) bzw. EGF (10 ng/ml) mit dem Inhibitor vorinkubiert worden. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-8$ unabhängigen Experimenten mit drei verschiedenen Zelllinien. * $p < 0,05$ bezogen auf Ko; ** $p < 0,05$ bezogen auf Thr; # $p < 0,05$ bezogen auf Ko, ## $p < 0,05$ bezogen auf EGF.

Im Western Blot wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die Thrombin- oder TRAP-6-induzierte p44/42-MAPK-Aktivierung nicht durch eine Vorbehandlung der Zellen mit AG1478 (2µM) vor der 20-minütigen Thrombin- bzw. 10-minütigen TRAP-6-Stimulation hemmbar war (Abb. 19). Im Gegensatz dazu wurde die EGF (100 ng/ml)-vermittelte p44/42-MAPK-Aktivierung vollständig durch AG1478 (2µM) blockiert.

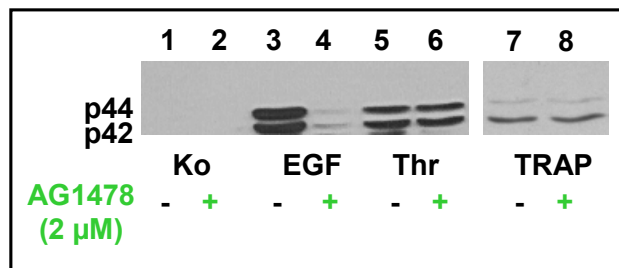


Abb. 19: Der spezifische EGFR-Inhibitor AG1478 (2μM) hat keinen Einfluss auf die Thrombin- bzw. TRAP-induzierte p44/42-MAPK-Aktivierung. Der Inhibitor war 1 h vor Stimulation mit 10 nM Thrombin (Thr) bzw. 100 ng/ml EGF bzw. 100 μM TRAP-6 auf die Zellen gegeben worden. Spur 1: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle), Spur 2: AG1478 vorbehandelt, Spur 3: 5 min stimuliert mit EGF, Spur 4: AG1478 vorbehandelt und 5 min mit EGF stimuliert, Spur 5: 20 min mit Thrombin stimuliert, Spur 6: AG1478 vorbehandelt und 20 min mit Thrombin stimuliert, Spur 7: 10 min mit TRAP stimuliert, Spur 8: AG1478 vorbehandelt und 10 min mit TRAP stimuliert. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für fünf unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

3.6 Rolle der PI3-Kinase bei der p44/42-MAPK-Aktivierung und der Thrombin-induzierten DNA-Synthese

Die PI3-Kinase generiert *second messengers* durch Phosphorylierung von Phosphoinositiden und gibt Signale über die Proteinkinase C, die p70-S6-Kinase und die Akt-Kinase weiter (Toker & Cantley, 1997). Vor einiger Zeit wurde die Beteiligung der PI3-Kinase in der Verbindung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit der Aktivierung der p44/42-MAPK gezeigt (Lopez-Illasaca et al., 1997; Keffel et al., 1999). Deshalb war von Interesse, ob die PI3-Kinase auch an der Aktivierung der p44/42-MAPK durch Thrombin und TRAP und an der Thrombin-induzierten DNA-Synthese in BCA-SMC beteiligt ist. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde der spezifische PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst 1 h mit LY294002 in einer Konzentration von 3 μM bei 37°C vorinkubiert, bevor sie 20 min mit Thrombin (10 nM) bzw. 10 min mit TRAP-6 (100 μM) stimuliert wurden. Abb. 20 zeigt, dass LY294002 keinen signifikanten Effekt weder auf die basale noch auf die Thrombin- bzw. TRAP-induzierte p44/42-MAPK-Phosphorylierung hat. Das weist daraufhin, dass die PI3-Kinase nicht in die p44/42-MAPK-Aktivierung involviert ist.

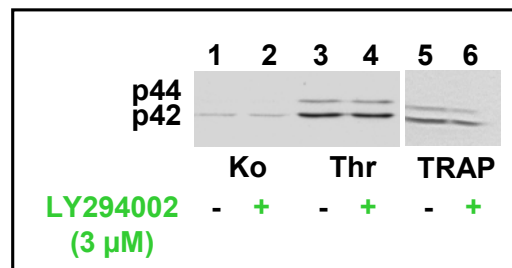


Abb. 20: Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die MAPK-Phosphorylierung induziert durch Thrombin (Thr; 10 nM; 20 min) bzw. TRAP-6 (100 μM; 10 min). Spur 1: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle), Spur 2: LY294002 vorbehandelt, Spur 3: Thrombin stimuliert, Spur 4: LY294002 vorbehandelt und Thrombin stimuliert, Spur 5: TRAP stimuliert, Spur 6: LY294002 vorbehandelt und TRAP stimuliert. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

Allerdings scheint die PI3-Kinase an der Thrombin-induzierten DNA-Synthese beteiligt zu sein, da LY294002 in den Konzentrationen von 1 μM bis 10 μM den [³H]-Thymidineinbau signifikant reduzierte (Abb. 21).

Zur Positivkontrolle wurden die Zellen mit EGF (10 ng/ml) stimuliert, da bekannt ist, dass die PI3-Kinase in die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, wie EGF, eingeschaltet ist (Krymskaya et al., 1999; Bancroft et al., 2002). Wie erwartet, wurde die EGF-induzierte [³H]-Thymidineinbaurate signifikant durch LY294002 in den Konzentrationen von 1 μM bis 10 μM vermindert (Abb. 21).

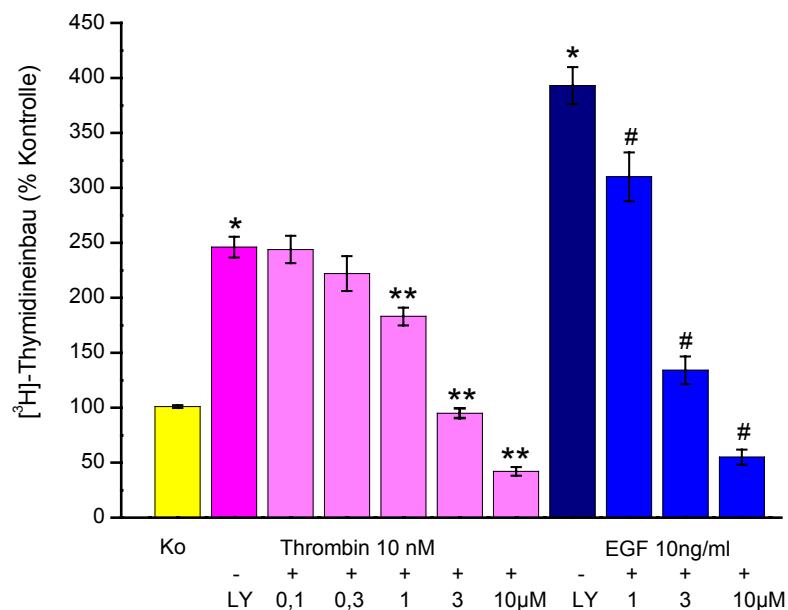


Abb. 21: Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die Thrombin- bzw. EGF-induzierte DNA-Synthese. Die Zellen waren 1 h mit LY294002 vorbehandelt und dann mit Thrombin (10 nM) bzw. EGF (10 ng/ml) oder PBS als Kontrolle stimuliert worden. Gezeigt ist die [³H]-Thymidineinbaurate verglichen mit nicht stimulierten Zellen (Kontrolle, Ko) nach 24-stündiger Stimulation. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 5$ separaten Experimenten mit drei verschiedenen Zelllinien. * $p < 0,05$ bezogen auf Kontrolle, ** $p < 0,05$ bezogen auf Thr; # $p < 0,05$ bezogen auf EGF.

3.7 Beteiligung Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiver G-Proteine am mitogenen Signalweg von Thrombin

Thrombin ist in der Lage, in verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen G-Proteinen zu interagieren, da der Thrombinrezeptor PAR-1 mindestens an drei verschiedene G-Proteine ($G_{12/13}$, G_q und G_i) gekoppelt sein kann (Hung et al., 1992; Offermanns et al., 1994; Barr et al., 1997; Hollenberg & Compton, 2002). Es ist bekannt, dass bei Fibroblasten die mitogene Wirkung von Thrombin durch einen PTX-empfindlichen Schritt limitiert wird (Chambard et al., 1987; van Corven et al., 1993). Auch in Endothelzellen stimuliert Thrombin die DNA-Synthese über die Aktivierung von G_i (Ellis et al., 1999). In humanen Gefäßmuskelzellen sind ebenfalls PTX-sensitive G_i -Proteine an der Weiterleitung des Thrombin-Signals beteiligt (Kanthou et al., 1996). Es stellte sich daraufhin die Frage, wel-

che G-Proteine in die Thrombin-induzierte Mitogenese in BCA-SMC eingeschaltet sind. Durch Vorbehandlung der Zellen mit PTX lassen sich diese G-Proteine eingrenzen. PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung eines Cysteinrestes an der Position 4 vom C-Terminus der meisten G_α -Untereinheiten der G_i -Familie. Dadurch wird die Kopplung der G-Proteine an den Rezeptor gehemmt (Fields & Casey, 1997). Die Zellen wurden bis zu 24 h mit PTX in den Konzentrationen von 100 ng/ml bis 500 ng/ml vorinkubiert und anschließend mit Thrombin stimuliert. Diese Behandlung der Zellen führte weder zu einer Veränderung der [3 H]-Thymidineinbaurrate nach Stimulation mit Thrombin (Abb. 22), noch zu einer Hemmung der Thrombin- und TRAP-induzierten p44/42-MAPK-Aktivierung nach 24-stündiger Vorinkubation mit PTX 200 ng/ml (Abb. 23).

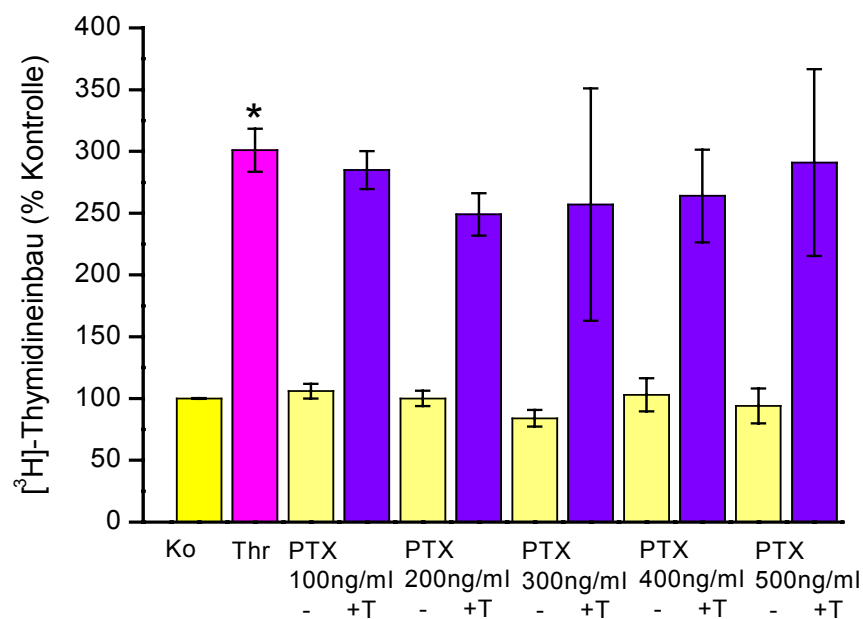


Abb. 22: Pertussis Toxin (PTX) zeigt keinen signifikanten Einfluss auf den Thrombin-induzierten [3 H]-Thymidineinbau, verglichen mit nicht stimulierten Zellen (Kontrolle, Ko). Die Zellen waren bis zu 24 h vor Stimulation mit Thrombin (Thr/T) mit PTX vorinkubiert worden. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 4-8$ unabhängigen Experimenten mit zwei verschiedenen Zelllinien. * $p < 0,05$ bezogen auf Kontrolle.

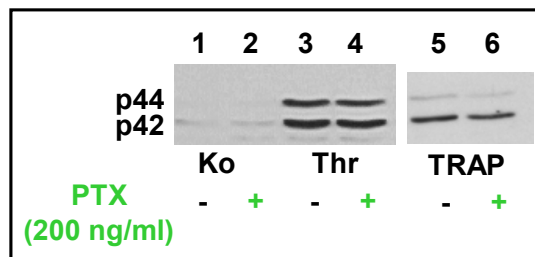


Abb. 23: PTX zeigt keinen Einfluss auf die p44/42-MAPK-Aktivierung. Die Zellen wurden für 24 h mit PTX (200 ng/ml) vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit Thrombin (Thr, 10 nM) bzw. TRAP-6 (100 μ M) für 20 bzw. 10 min stimuliert. Spur 1: nicht-stimulierte Zellen (Kontrolle, Ko), Spur 2: nur PTX vorbehandelt, Spur 3: Thrombin stimuliert, Spur 4: PTX vorbehandelt und Thrombin stimuliert, Spur 5: TRAP stimuliert, Spur 6: PTX vorbehandelt und TRAP stimuliert. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für fünf unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

Auch durch Untersuchung der PTX-katalysierten ADP-Ribosylierung von G_i -Proteinen aus Membranen von BCA-SMC wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den mit Thrombin bzw. TRAP behandelten SMC nachgewiesen. Mit diesem Versuch wurde bestätigt, dass das verwendete PTX aktiv ist und die vorhandenen G_i -Proteine vollständig gehemmt wurden. Da aber in Gegenwart von PTX sowohl die DNA-Synthese als auch die p44/42-MAPK-Aktivierung unbeeinflusst blieb, können diese Wirkungen nicht über G_i -Proteine zustande gekommen sein. Diese Resultate zeigen, dass der Thrombinrezeptor PAR-1 in BCA-SMC ein PTX-insensitives G-Protein aktiviert.

3.8 Einfluss von Thrombin und TRAP-6 auf den cAMP-Spiegel

Da bekanntlich eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels antimitogen wirkt (Kanthou et al., 1996; Stork & Schmitt, 2002) und die Proliferation arterieller SMC's hemmt (Rybalkin & Bornfeldt, 1999; Koyama et al., 2001), wurde die Wirkung von Thrombin und TRAP auf die zellulären cAMP-Spiegel untersucht. Im Umkehrschluß wurde vermutet, dass Thrombin seine mitogene Wirkung über eine Reduzierung des intrazellulären cAMP entfaltet. Für Fibroblasten wurde allerdings beschrieben, dass TRAP ebenso wie Thrombin die Adenylatzyklase hemmt (Vouret-Craviari et al., 1992).

In Abb. 24 und 25 sind die intrazellulären cAMP-Spiegel (in pmol cAMP pro mg Protein) nach Thrombin- bzw. TRAP-6-Stimulation dargestellt. Die Stimulationen wurden alle in

Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers IBMX (0,1 mM) durchgeführt, so dass Veränderungen im zellulären cAMP-Gehalt auf eine verminderte Aktivität der Adenylatzyklase und nicht auf eine veränderte PDE-Aktivität zurückzuführen sind. Die Zellen waren entweder mit Forskolin (1 μ M) oder Prostaglandin E₁ (5 μ M), welche die Adenylatzyklase über unterschiedliche Mechanismen aktivieren, stimuliert worden. Daher war es möglich, den Einfluss von Thrombin bzw. TRAP-6 sowohl auf den basalen, als auch auf den erhöhten cAMP-Spiegel zu bestimmen. Der cAMP-Gehalt war mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt worden.

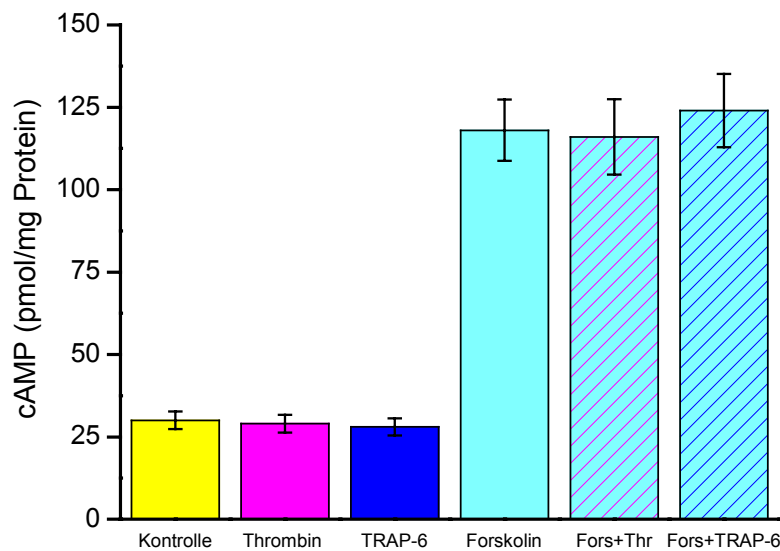


Abb. 24: cAMP-Spiegel nach Stimulation von BCA-SMC mit Forskolin (1 μ M), Thrombin (Thr; 10 nM) und TRAP-6 (100 μ M). Die 30-minütige Stimulation wurde in serumfreiem Medium in Gegenwart von IBMX (0,1 mM) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und der cAMP-Gehalt mittels Radioimmunoassay bestimmt. Mittelwerte \pm SEM aus sechs unabhängigen Experimenten mit drei unterschiedlichen Zelllinien.

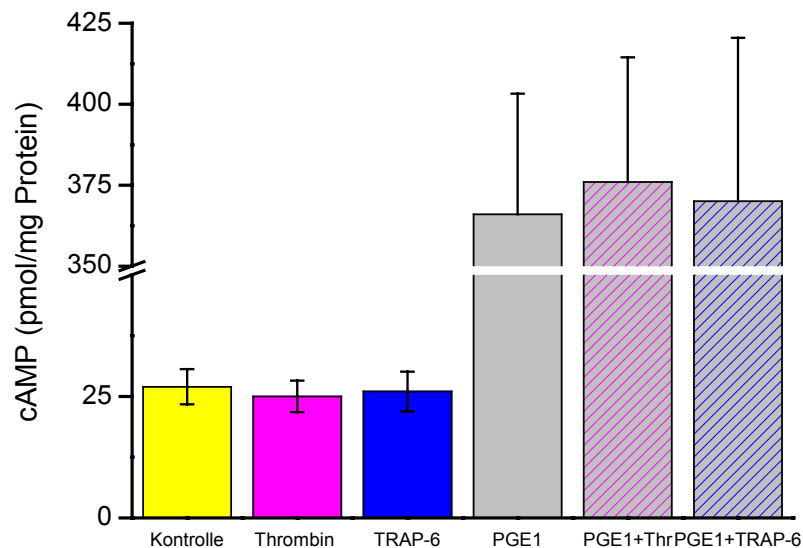


Abb. 25: cAMP-Spiegel nach Stimulation von BCA-SMC mit PGE₁ (5 μ M), Thrombin (Thr; 10 nM) und TRAP-6 (100 μ M). Die 30-minütige Stimulation wurde in serumfreiem Medium in Gegenwart von IBMX (0,1 mM) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und der cAMP-Gehalt mittels Radioimmunoassay bestimmt. Mittelwerte \pm SEM aus sechs unabhängigen Experimenten mit drei unterschiedlichen Zelllinien.

Weder bei den Forskolin- oder PGE₁-vorbehandelten Zellen noch bei den nicht stimulierten Zellen konnte ein Einfluss von Thrombin oder TRAP auf den cAMP-Spiegel festgestellt werden. Demnach wirkt Thrombin in BCA-SMC nicht über ein G_i-Protein und kann daher auch nicht die Adenylatzyklase inhibieren und die cAMP-Synthese reduzieren.

Zusätzlich sollte der Einfluss von Adenylatzyklaseaktivatoren auf die p44/42-MAPK-Phosphorylierung durch Thrombin und TRAP untersucht werden. Dazu waren die Zellen zunächst mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX (0,1 mM) für 10 min vorinkubiert worden. Die anschließende 15-minütige Stimulation mit Thrombin (10 nM) bzw. TRAP-6 (100 μ M) oder PBS als Kontrolle erfolgte zum Teil in Gegenwart von Forskolin (1 μ M) bzw. Prostaglandin E₁ (5 μ M), wodurch die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht wurden. Die nachfolgende Untersuchung der so vorbehandelten Zellen im Western Blot zeigte, dass

sowohl die Thrombin- als auch die TRAP-induzierte MAPK-Aktivierung durch Forskolin bzw. PGE₁ gehemmt wurde (Abb. 26). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass in die Thrombin-Signaltransduktion in BCA-SMC kein G_i-Protein involviert ist, da sonst über G_i eine Aufhebung der Forskolin- bzw. PGE₁-Wirkung nach Thrombin- bzw. TRAP-Stimulation zu erwarten wäre und damit die MAPK-Aktivierung unbeeinflusst bliebe.

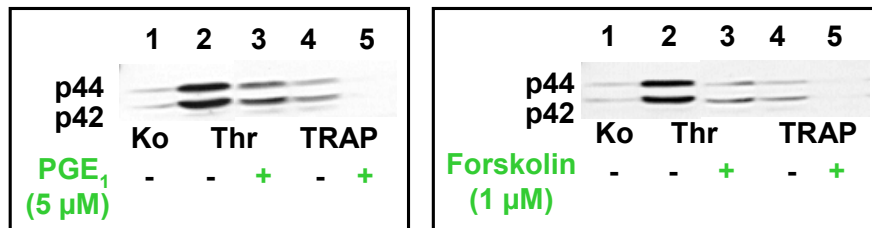


Abb. 26: Hemmung der Thrombin- bzw. TRAP-6-induzierten p44/42-MAPK-Aktivierung nach Stimulation von BCA-SMC durch gleichzeitige Gabe von Forskolin (1 µM) bzw. Prostaglandin E₁ (5 µM) mit Thrombin (10 nM) bzw. TRAP-6 (100 µM). Die 15-minütige Stimulation wurde in serumfreiem Medium in Gegenwart von IBMX (0,1 mM) durchgeführt. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

Der Einfluss der Adenylatzyklaseaktivatoren auf die Thrombin-induzierte DNA-Synthese wurde ebenfalls untersucht. Die 24-stündige Inkubation der Zellen mit diesen Substanzen verursachte eine derartig starke Reduktion der [³H]-Thymidineinbaurate, dass ein toxischer Effekt zu vermuten ist und man von einer unspezifischen Wirkung ausgehen kann.

3.9 Effekte von Thrombin und TRAP auf die Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase in glatten Muskelzellen

Anfängliche Untersuchungen der p38-MAPK zeigten zunächst nur eine Beteiligung an zellulären Reaktionen auf Streß. Neuere Ergebnisse weisen dagegen nach, dass die p38-MAPK auch infolge mitogener Prozesse aktiviert wird (Kanda et al., 2001b). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob durch die Stimulation von BCA-SMC mit Thrombin oder TRAP die p38-MAPK phosphoryliert und damit aktiviert wird. Sowohl Thrombin (10 nM) als auch TRAP (100 µM) bewirken eine zeitabhängige Aktivierung der p38-MAPK in BCA-SMC, wie im Western Blot gezeigt wurde (Abb. 27). In Abb. 27 ist der Verlauf der p38-MAPK-Aktivierung in einem Zeitraum von 5 min bis 120 min dargestellt. Die Zellen waren entweder mit Thrombin oder mit TRAP für jeweils 5 min, 10 min, 20 min, 30 min,

60 min und 120 min stimuliert worden. Als Vergleich dienten nicht stimulierte Zellen (0 = Kontrolle). Dieser Versuch wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen die phosphorylierte und damit aktivierte p38-MAPK durchgeführt. Das Aktivierungsmaximum wurde sowohl bei Thrombin- als auch bei TRAP-Stimulation nach einer Dauer von 30 min sichtbar. Nach 60-minütiger Stimulation ließ die Aktivierung bereits nach, so dass nach 120 min wieder ein basaler Phosphorylierungszustand erreicht war.

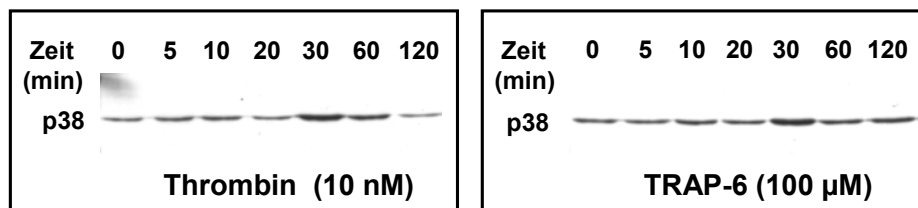


Abb. 27: Zeitabhängige Stimulation der p38-MAPK durch Thrombin (10 nM) und TRAP-6 (100 µM) nachgewiesen mittels Western Blot. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

4 Diskussion

Trotz beachtlicher Fortschritte in der Forschung und daraus resultierenden Erkenntnissen über die Entstehung und den Verlauf von Herz-Kreislaufkrankungen sind die therapeutischen Maßnahmen noch nicht dauerhaft erfolgreich. Wie einleitend dargestellt, kommt es noch immer bei 30-40 % der mittels Ballonkatheterdilatation behandelten Patienten mit ischämischer Herzkrankheit nach 3-6 Monaten in den Koronargefäßen zu einer Restenose als „*response to injury*“. Die zellulären Mechanismen, die dieser Reaktion zugrunde liegen, sind noch nicht bis ins Detail geklärt. Deshalb versucht man zunächst an isolierten Zellen in Kultur grundlegende Abläufe nachzuvollziehen, um sie später in komplexere Zusammenhänge mit anderen Erkenntnissen, z.B. aus Tiermodellen, einzubauen und um damit das Gesamtbild der Entstehung und Charakteristik von restenotischen Veränderungen zu erfassen.

4.1 Thrombin und TRAP aktivieren die p44/42-MAPK in BCA-SMC, aber nur Thrombin initiiert die DNA-Synthese

Thrombin stimuliert die Zellproliferation über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen, einschließlich Gefäßmuskelzellen (Stouffer et al., 1993; McNamara et al., 1993). Die mitogenen Effekte von Wachstumsfaktoren werden durch eine Aktivierung der p44/42-MAPK ausgelöst, welche die Genexpression und den Eintritt in den Zellzyklus zur Zellproliferation reguliert (Brunet et al., 1999). Es liegen verschiedene Beweise dafür vor, dass Thrombin die MAPK in einer Vielzahl von Zellen aktiviert (Macfarlane et al., 2001). Die schnell wachsende Zahl der Einzelergebnisse verfestigt die Erkenntnis, dass vermutlich wenige Hauptwege der Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zur MAPK existieren. Deren Verschaltung untereinander ist in starkem Maße vom Zelltyp, d.h. der genetisch determinierten Ausstattung einer Zelle mit entsprechenden Signaltransduktionsproteinen, abhängig. Der Mechanismus der Thrombin-induzierten Signaltransduktion sollte daher in BCA-SMC untersucht werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand vor allem darin, den Unterschied zwischen der Thrombin-induzierten Signaltransduktion und den TRAP-vermittelten Reaktionen in BCA-SMC näher zu analysieren. Dass es wesentliche Unterschiede in der Wirkung beider Sub-

stanzen gibt, wurde gleich zu Beginn der Untersuchungen bestätigt. Es wurde gezeigt, dass nur Thrombin in BCA-SMC eine DNA-Synthese induzieren kann und TRAP dagegen keinen Einfluss auf den [^3H]-Thymidineinbau ausübt. Die erste Annahme, dass TRAP evtl. in der langen Inkubationsphase durch zellständige Peptidasen abgebaut wird, konnte schnell widerlegt werden, da TRAP-haltiges Kulturmedium auch nach 24 h noch eine Plättchenaggregation auslöste. Um den Signaltransduktionsweg der Thrombin-induzierten Mitogenese zu erforschen, wurde untersucht, ob Thrombin und eventuell auch TRAP die p44/42-MAPK aktivieren können, da diese eine entscheidende Komponente im Verlauf der Zellproliferation darstellt. Wie schon für andere Zelltypen gezeigt (Vouret-Craviari et al., 1993; Macfarlane et al., 2001), waren sowohl Thrombin als auch TRAP in der Lage, in BCA-SMC die p44/42-MAPK zu aktivieren. Es ergab sich daher die Annahme, dass die Thrombin-induzierte DNA-Synthese durch die Aktivierung der p44/42-MAPK vermittelt wird. Um die Aktivierung der MAPK-Kaskade zu verhindern, wurden bekannte Hemmstoffe eingesetzt. MAPK-Inhibitoren sind geeignete Mittel, um die Rolle der MAPK-Kaskade in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen zu analysieren (Cohen, 1999). Sowohl der Thrombin-induzierte [^3H]-Thymidineinbau als auch die p44/42-MAPK-Aktivierung wurden durch die MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 gehemmt. Somit war gezeigt, dass die p44/42-MAPK-Aktivierung für die DNA-Synthese essentiell ist, jedoch nicht allein ausreicht, da TRAP auch die p44/42-MAPK aktiviert aber trotzdem nicht die DNA-Synthese in BCA-SMC induziert. Es ist aus diesen Ergebnissen anzunehmen, dass noch zusätzliche Komponenten in die Signaltransduktion des Thrombins involviert sind, die TRAP nicht beeinflusst und deshalb keinen mitogenen Effekt in BCA-SMC auslöst. Es galt daher, mittels Ausschlussprinzip die in Frage kommenden Transduktionswege zu prüfen. Die bisherigen Erkenntnisse wurden bereits in der Einleitung ausführlich diskutiert (siehe 1.4 „Der mitogene Effekt von Thrombin“).

Auch die Möglichkeit der Aktivierung von PAR-4 in BCA-SMC wurde ausgeschlossen, da ein PAR-4-aktivierendes Peptid keinerlei Wirkung weder auf die DNA-Synthese noch auf eine Aktivierung der p44/42-MAPK zeigte. Damit konnte die zunächst aufgestellte Hypothese, dass Thrombin eventuell über einen weiteren Rezeptor wirkt und eine Aktivierung von PAR-1 durch TRAP deshalb nicht ausreicht, widerlegt werden.

4.2 PDGF spielt keine Rolle bei der Thrombin-induzierten Mitogenese in BCA-SMC, aber bFGF ist beteiligt

PDGF, für den eine Beteiligung an der Thrombin-induzierten Mitogenese angenommen wird (Kanthou et al., 1992; Stouffer et al., 1993; Cucina et al., 1999; Okazaki et al., 1992; Bydlowski et al., 1998), konnte als autokriner Wachstumsfaktor in BCA-SMC ausgeschlossen werden. Bei Anwesenheit eines anti-PDGF-Antikörpers wurde nur die PDGF-induzierte DNA-Synthese verhindert. Der Thrombin-ausgelöste [^3H]-Thymidineinbau wurde jedoch nicht beeinflusst. In Bezug auf die Rolle von bFGF bei der Thrombin-induzierten Mitogenese in BCA-SMC kann nicht so eine klare Aussage getroffen werden. Dass bFGF beteiligt ist, wird aus den vorliegenden Untersuchungen vermutet. Sowohl die Thrombin-induzierte DNA-Synthese als auch die p44/42-MAPK-Aktivierung konnten durch einen Antikörper gegen bFGF gehemmt werden. Auch die [^3H]-Thymidineinbaurate nach Stimulation mit konditioniertem Medium ließ sich durch Vorbehandlung mit dem bFGF-Antikörper reduzieren. So konnte indirekt auf eine bFGF-Beteiligung geschlossen werden, aber eine bFGF-Freisetzung war nicht messbar. Vermutlich werden nur so geringe Mengen an bFGF ins Medium abgegeben, dass diese Konzentrationen mit einem ELISA nicht mehr erfasst werden, sie aber doch noch ausreichend sind, um minimale zelluläre Reaktionen auszulösen. Wahrscheinlich findet bereits eine basale bFGF-Bildung der Zellen, unabhängig von einer Stimulation, statt. Thrombin ist, im Gegensatz zu TRAP, in der Lage, den Effekt vom ohnehin produzierten bFGF zu potenzieren (Bretschneider et al., 1997) ohne zusätzlich eine bFGF-Freisetzung hervorzurufen. Dafür spricht auch das Ergebnis, dass selbst konditioniertes Medium von nicht stimulierten Zellen eine Steigerung der DNA-Synthese bewirkte, wobei dieser Effekt nur teilweise durch den bFGF-Antikörper gehemmt wurde. Da keine gesteigerte bFGF-Freisetzung nach Thrombinstimulation messbar war, kommt bFGF nicht als alleinige Komponente für einen zusätzlichen Signaltransduktionsweg in Betracht. So liegt der Schluß nahe, dass noch weitere Mediatoren in die Thrombin-ausgelöste Signaltransduktion eingeschaltet sein müssen.

4.3 Eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors ist weder für die p44/42-MAPK-Aktivierung noch für die DNA-Synthese notwendig

In den letzten Jahren wurde von einigen Arbeitsgruppen gezeigt, dass GPCRs ihre Signale über die Tyrosinphosphorylierung eines Wachstumsfaktor-Rezeptors (Transaktivierung) auf die MAPK übertragen können. So phosphoryliert Thrombin den EGF-R in Fibroblasten unabhängig von EGF (Daub et al., 1996; Daub et al., 1997). In Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta führte die Thrombin-induzierte EGF-R-Tyrosinphosphorylierung zu einer Aktivierung der p38-MAPK. Das wurde aus der Tatsache abgeleitet, dass der EGF-R-Inhibitor AG1478 die p38-MAPK-Aktivierung konzentrationsabhängig hemmte (Kanda et al., 2001a). Auch die Thrombin-induzierte DNA-Synthese wurde durch AG1478 gehemmt. Dies belegt, dass die EGF-R-Transaktivierung und nachfolgende p38-MAPK-Aktivierung für die Thrombin-induzierte Proliferation von Gefäßmuskelzellen benötigt wird (Kanda et al., 2001a). In den vorliegenden Untersuchungen wurde daher geprüft, ob AG1478, ein Hemmstoff, der als spezifisch für die EGF-R-Tyrosinkinase gilt (Osherov & Levitzki, 1994), einen Einfluss auf die Stimulierung der p44/42-MAPK durch Thrombin oder TRAP und die Thrombin-induzierte DNA-Synthese in BCA-SMC hat. Unter den gewählten Standardbedingungen beeinflusste AG1478 weder die p44/42-MAPK-Aktivierung noch den [³H]-Thymidineinbau. Im Gegensatz zu den oben zitierten Untersuchungen zeigt dieser Befund, dass die Transaktivierung des EGF-R im Signalweg des Thrombins in BCA-SMC keine essentielle Rolle spielt.

4.4 Die PI3-Kinase ist in die Thrombin-induzierte Mitogenese in BCA-SMC involviert, reguliert aber nicht die p44/42-MAPK

Eine weitere Frage war, ob in BCA-SMC die PI3-Kinase als mögliches Intermediat in die Signalübertragung vom Thrombinrezeptor involviert ist, da G_{βγ}-Untereinheiten Signale über die PI3-Kinase zur MAPK weiterleiten können (Nakanishi et al., 1995; Lopez-Illasaca et al., 1997). Um zu prüfen, ob die PI3-Kinase eventuell beteiligt ist, wurde der spezifische PI3-Kinase-Inhibitor LY29004 eingesetzt. Die Vorbehandlung der Zellen mit diesem Hemmstoff verminderte die [³H]-Thymidineinbaurate signifikant. Dieses Resultat ist ein Hinweis darauf, dass Thrombin eine PI3-Kinase-Aktivierung zur Entfaltung seines mitoge-

nen Effektes in BCA-SMC benötigt. Diese Aussage steht im Gegensatz zu der von Weiss et al. (1995) aufgestellten Hypothese, dass die PI3-Kinase für die mitogene Thrombinwirkung in SMC nicht benötigt wird. Allerdings wurde die p44/42-MAPK-Aktivierung nicht durch die PI3-Kinase-Hemmung beeinflusst. Das bedeutet, dass die p44/42-MAPK nicht durch die PI3-Kinase reguliert wird. Ein zusätzlicher, durch die PI3-Kinase vermittelter Signaltransduktionsweg scheint daher an der Thrombin-induzierten DNA-Synthese beteiligt zu sein. Ähnliche Beobachtungen wurden kürzlich auch für Fibroblasten beschrieben (Goel et al., 2002). Aufgrund dieser Befunde könnte spekuliert werden, dass möglicherweise diese PI3-Kinase-Aktivierung nur durch Thrombin, nicht aber durch TRAP erfolgt. Damit könnte auch das Ausbleiben einer mitogenen Wirkung von TRAP erklärt werden.

4.5 Thrombin und TRAP beeinflussen den intrazellulären cAMP-Spiegel nicht

Es gibt verschiedene Hinweise, dass $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten von PTX-sensitiven G-Proteinen ihre Signale über die PI3-Kinase vermitteln (Nakanishi et al., 1995; Lopez-Illasaca et al., 1997). Da eine Beteiligung der PI3-Kinase an der Thrombin-induzierten DNA-Synthese in BCA-SMC gezeigt werden konnte, sollte nachgewiesen werden, ob vermutlich G_i -Proteine beteiligt sind. Diese Hypothese wurde auch durch die Befunde von Kanthou et al. (1996) gestützt, die eine antimitogene Wirkung durch hohe intrazelluläre cAMP-Spiegel zeigten. Demzufolge könnte Thrombin seine mitogene Wirkung eventuell über die Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration entfalten. Grundvoraussetzung dazu wäre allerdings die Beteiligung von G_i -Proteinen, über welche eine Hemmung der Adenylatzyklase vermittelt wird. So wurde angenommen, dass nur Thrombin, nicht aber TRAP, einen Einfluss auf die zellulären cAMP-Spiegel hat. Unsere Befunde widerlegten jedoch diese Hypothese, da weder Thrombin noch TRAP den cAMP-Spiegel beeinflussten. Aufgrund dieser Resultate wird vermutet, dass in die Signalweiterleitung nach Thrombin- bzw. TRAP-Stimulation keine G_i -Proteine eingeschaltet sind und deswegen die Adenylatzyklase und damit der cAMP-Stoffwechsel unverändert bleiben. Zusätzlich wurde noch der Einfluss von Aktivatoren der Adenylatzyklase auf die Aktivierung der p44/42-MAPK untersucht. Es zeigte sich eine Hemmung der Thrombin- bzw. TRAP-induzierten MAPK-Aktivierung durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem Adenylatzyklase-aktivierenden Diterpen

Forskolin. Dieses greift direkt, d.h. ohne Interaktion mit exogenen Rezeptoren, am katalytischen Zentrum der Adenylatzyklase an und aktiviert das Enzym. Prostaglandin E_1 , dass rezeptorvermittelt die Adenylatzyklase stimuliert, bewirkte den selben Effekt. Erklären lässt sich dieses Resultat möglicherweise dadurch, dass die Forskolin- bzw. PGE_1 -induzierte cAMP-Steigerung eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) bewirkt. Diese wiederum ist in der Lage, inhibierend auf die MAPK-Signalkaskade einzuwirken (Bornfeldt & Krebs, 1999; Stork & Schmitt, 2002). Stork et al. beschreiben, dass die PKA die MAPK-Kaskade inhibiert, indem sie die Kopplung von Ras und Raf-1 mit Hilfe des kleinen G-Proteins Rap 1 unterbricht. Rap 1 ist dabei für den inhibitorischen Effekt von cAMP auf die MAPK und das Zellwachstum essentiell (Schmitt & Stork, 2001). Unsere Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass in die Thrombin-Signaltransduktion in BCA-SMC kein G_i -Protein involviert ist. Wenn Thrombin über ein G_i -Protein wirken würde, müsste die Adenylatzyklase gehemmt, die intrazellulären cAMP-Spiegel reduziert und dadurch die Proteinkinase A in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden. Die Aktivierung der p44/42-MAPK dürfte dann durch Adenylatzyklaseaktivatoren unbeeinflusst bleiben. Eine andere Erklärung für den beobachteten inhibitorischen Effekt auf die Phosphorylierung der p44/42-MAPK könnte die Möglichkeit der Aktivierung von dual-spezifischen MAPK-Phosphatasen durch cAMP sein (Burgun et al., 2000).

4.6 Pertussis Toxin (PTX)-insensitive G-Proteine sind an der Signalweiterleitung beteiligt

Gut gesichert ist die Tatsache, dass Thrombin die Protease-aktivierbaren Rezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 aktiviert, welche an GTP-bindende Proteine gekoppelt sind (Ishihara et al., 1997; Xu et al., 1998; Vu et al., 1991a). Diese G-Proteine sind bisher nur für PAR-1 charakterisiert (Hollenberg & Compton, 2002). Bei der Plättchenaktivierung zeigt Thrombin eine duale Rolle (Kahn et al., 1998). So kann in Plättchen die intrazelluläre Signaltransduktion bei Aktivierung von PAR-1 einerseits über ein G_q -Protein (Aktivierung der Phospholipase C) ablaufen, zum anderen über ein G_i -Protein zur Hemmung der Adenylatzyklase führen. Diese Signaltransduktionswege könnten auch in anderen Zelltypen, einschließlich BCA-SMC, existieren. Kürzlich wurde gezeigt, dass kultivierte tracheale SMC mRNA von PAR-1, PAR-2 und PAR-3 exprimieren (Hauck et al., 1999). Daher kann

Thrombin mehr als einen PAR aktivieren, wobei die Möglichkeit der Kopplung an verschiedene Arten von G-Proteinen besteht. Auch in CCL-39-Zellen kann der klonierte Thrombinrezeptor über mindestens zwei verschiedene Mechanismen, wahrscheinlich G_q - bzw. G_i -ähnliche G-Proteine, sowohl an die Phosphoinositid-Hydrolyse als auch an eine Hemmung der Adenylatzyklase gekoppelt sein (Hung et al., 1992). Um abschließend zu prüfen, ob G_i -Proteine in die Thrombin- bzw. TRAP-induzierte p44/42-MAPK-Aktivierung und in den Thrombin-vermittelten [3 H]-Thymidineinbau in BCA-SMC involviert sind, wurde PTX zur Hemmung eines G_i -Protein-abhängigen Signalweges eingesetzt. Mit dieser Methode lässt sich direkt eine Beteiligung PTX-sensitiver G_i -Proteine bestimmen. Da weder die Aktivierung der p44/42-MAPK noch die DNA-Synthese durch eine PTX-Behandlung beeinflusst wurden, wird angenommen, dass PAR(s) in BCA-SMC nicht an G_i -Proteine gekoppelt sind. Zur Kontrolle wurde mittels der PTX-katalysierten ADP-Ribosylierung von G_i -Proteinen aus Membranen von BCA-SMC bestätigt, dass das verwendete PTX aktiv ist und die vorhandenen G_i -Proteine vollständig gehemmt wurden. Da aber trotz dieser Hemmung sowohl die DNA-Synthese als auch die p44/42-MAPK-Aktivierung unbeeinflusst blieb, können beide Wirkungen nicht über G_i -Proteine zustande gekommen sein.

4.7 Auch die p38-MAPK wird durch Thrombin und TRAP aktiviert

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Thrombin als auch TRAP die p38-MAPK mit gleichem zeitlichen Verlauf aktivieren. Allerdings kann keine Aussage über eine Beteiligung der p38-MAPK an der Thrombin-induzierten Mitogenese getroffen werden, da der p38-MAPK-Inhibitor SB202190 unklare Effekte auf den [3 H]-Thymidineinbau zeigte. Überraschenderweise wurde in den mit 5 μ M SB202190 behandelten und nicht stimulierten Proben ein signifikant erhöhter [3 H]-Thymidineinbau im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen (Kontrolle) gemessen. Das lässt vermuten, dass die Substanz SB202190 in einer Konzentration von 5 μ M einen stimulierenden Einfluss auf die Zellen ausübt. Dieser ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass SB202190 in dieser Konzentration die Raf-Kinase stimuliert (Kalmes et al., 1999). Auch bei einer Konzentration von 1 μ M ließ sich dieser Effekt noch nachweisen. Aus diesen Versuchen lässt sich daher keine Aussage treffen, inwieweit die Hemmung der p38-MAPK durch SB202190 die mitogene Thrombinwir-

kung beeinflusst. Es bleibt die Frage offen, ob die Aktivierung der p38-MAPK durch Thrombin und TRAP als Stressreaktion der Zellen auf die Stimulationsprozedur erfolgt, oder ob auch mitogene Effekte auf eine p38-MAPK-Aktivierung zurückzuführen sind. Da aber sowohl Thrombin als auch TRAP nach gleicher Stimulationsdauer zu einer gleich starken Aktivierung der p38-MAPK führen, kann dieser Fakt auch nicht die unterschiedliche mitogene Wirkung beider Substanzen erklären.

4.8 Ausblick

Die vergleichende Interpretation aller Daten führt zu der zusammenfassenden Feststellung, dass die Signaltransduktion in BCA-SMC unabhängig von einer EGF-R-Transaktivierung und ohne PDGF-Beteiligung erfolgt. bFGF wird aber zur Proliferation von BCA-SMC benötigt. Der mitogene Effekt von Thrombin wird durch eine Aktivierung des MEK/p44/42-MAPK *pathway* vermittelt. In BCA-SMC werden Thrombin-vermittelte Signale über ein Pertussis-Toxin-insensitives G-Protein, wie G_q oder $G_{12/13}$ weitergeleitet. Noch ist nicht geklärt, welche Rezeptoren endogen an $G_{12/13}$ -Signalwege gekoppelt sind (Neves et al., 2002). Allerdings ist bekannt, dass über $G_{\alpha_{13}}$ der PI3-Kinase-Signalweg aktiviert werden kann (Shi & Kehrl, 2001). Da auch in BCA-SMC die PI3-Kinase über einen zusätzlichen, nicht näher charakterisierten Signalweg in die Thrombin-induzierte Mitogenese involviert ist, wäre aufgrund dieser Befunde auch in BCA-SMC eine Kopplung von PAR-1 an ein G_{13} -Protein denkbar.

Die immer genauere Aufklärung der Thrombinrezeptor-vermittelten intrazellulären Effekte zeigt neue Wege für die pharmakologische Beeinflussung von thrombinvermittelten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie Entzündung, Wundheilung und Intimahyperplasie. Neben bekannten Thrombininhibitoren könnten in der Zukunft Thrombinrezeptorantagonisten und Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion auch für die Behandlung von Herz-Kreislauferkrankungen von Bedeutung sein. Damit tritt die targetorientierte Wirkstoffsuche als pharmakologisches Prinzip in den Vordergrund. Voraussetzung dafür bleibt jedoch die genaue Aufklärung der Mechanismen, die auf zellulärer Ebene ablaufen. Möglicherweise existierende Verbindungen im System der Signaltransduktion müssen weiter analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Bei der interventionellen Behandlung ischämischer Herzkrankheiten ist die Restenose, die auf eine Verdickung der Gefäßwand durch Proliferation glatter Muskelzellen zurückzuführen ist, das zentrale Problem. Aufgrund seiner mitogenen Wirkung wird Thrombin eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Restenose bzw. atherosklerotischer Prozesse zugeschrieben. Eine verstärkte Expression von Thrombinrezeptoren sowie eine lokale Konzentrationserhöhung von Thrombin in geschädigten und atherosklerotischen Gefäßen wurden nachgewiesen. Um den Einfluss von Thrombin auf die Mitogenese zu untersuchen, wurden Gefäßmuskelzellen aus Rinderkoronararterien (*bovine coronary artery smooth muscle cells*, BCA-SMC) in Zellkultur gezüchtet. Von besonderem Interesse waren vergleichende Untersuchungen mit Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (TRAP).

Die Untersuchungen ergaben, dass nur die Aktivierung des Thrombinrezeptors durch Thrombin selbst zur DNA-Synthese führte, welche mittels $^3\text{[H]}$ -Thymidineinbau bestimmt wurde. TRAP wirkte dagegen nicht mitogen in BCA-SMC. Jedoch sind sowohl Thrombin als auch TRAP in der Lage, die p44/42-MAPK zu aktivieren, wie im Western Blot nachgewiesen wurde. Dieser Schritt ist für die DNA-Synthese essentiell, reicht aber nicht allein aus, da TRAP auch die p44/42-MAPK aktiviert und trotzdem keine DNA-Synthese induziert. Auch durch die Beteiligung sekundärer Wachstumsfaktoren konnte dieses Problem nicht hinreichend geklärt werden, da PDGF als autokriner Wachstumsfaktor ausgeschlossen werden konnte und bFGF nur eine Teilrolle zu spielen scheint. Die Transaktivierung des EGF-Rezeptors ist ebenfalls nicht für die Thrombin-induzierte DNA-Synthese verantwortlich, da der spezifische EGF-Rezeptor-Inhibitor AG1478 keinen Einfluss auf $^3\text{[H]}$ -Thymidineinbau und p44/42-MAPK-Aktivierung zeigte. Dagegen ist möglicherweise die PI3-Kinase ursächlich an der mitogenen Thrombinwirkung beteiligt, da nur die Thrombin-induzierte DNA-Synthese, nicht aber die Thrombin- bzw. TRAP-vermittelte p44/42-MAPK-Aktivierung, durch den spezifischen PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 gehemmt wurde. Der Effekt von Thrombin bzw. TRAP in BCA-SMC wird nicht durch ein Pertussis-Toxin-sensitives G-Protein vermittelt. Deshalb wurde auch keine G_i -spezifische Wirkung auf die intrazellulären cAMP-Spiegel nachgewiesen.

Die Summe aller Einzelergebnisse führt zu der Schlussfolgerung, dass in BCA-SMC die MAPK nur über einen Signalweg aktiviert wird, aber für die DNA-Synthese ein dualer Signalweg verantwortlich ist. TRAP kann nur die MAPK aktivieren, aber nicht weitere Schritte einleiten und wirkt deshalb nicht mitogen in BCA-SMC.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB & Rosner MR. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1301-12
- 2 Ahn HS, Foster C, Boykow G, Stamford A, Manna M & Graziano M. Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3, 2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1425-34
- 3 Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT & Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1995; 270: 27489-94
- 4 Andrade-Gordon P, Derian CK, Maryanoff BE, Zhang HC, Addo MF, Cheung W, Damiano BP, D'Andrea MR, Darrow AL, de Garavilla L, Eckardt AJ, Giardino EC, Haertlein BJ & McComsey DF. Administration of a potent antagonist of protease-activated receptor-1 (PAR-1) attenuates vascular restenosis following balloon angioplasty in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 34-42
- 5 Andrade-Gordon P, Maryanoff BE, Derian CK, Zhang HC, Addo MF, Darrow AL, Eckardt AJ, Hoekstra WJ, McComsey DF, Oksenberg D, Reynolds EE, Santulli RJ, Scarborough RM, Smith CE & White KB. Design, synthesis, and biological characterization of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12257-62
- 6 Aragay AM, Collins LR, Post GR, Watson AJ, Feramisco JR, Brown JH & Simon MI. G12 requirement for thrombin-stimulated gene expression and DNA synthesis in 1321N1 astrocytoma cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 20073-7
- 7 Bachhuber BG, Sarembock IJ, Gimple LW, McNamara CA & Owens GK. Thrombin-induced mitogenesis in cultured aortic smooth muscle cells requires prolonged thrombin exposure. *Am J Physiol* 1995; 268: C1141-7
- 8 Bancroft CC, Chen Z, Yeh J, Sunwoo JB, Yeh NT, Jackson S, Jackson C & Van Waes C. Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer* 2002; 99: 538-48
- 9 Barr AJ, Brass LF & Manning DR. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling. *J Biol Chem* 1997; 272: 2223-9

- 10 Bar-Shavit R, Benezra M, Eldor A, Hy-Am E, Fenton JW, 2nd, Wilner GD & Vlodavsky I. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. *Cell Regul* 1990; 1: 453-63
- 11 Bar-Shavit R, Benezra M, Sabbah V, Bode W & Vlodavsky I. Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 123-30
- 12 Bar-Shavit R, Kahn AJ, Mann KG & Wilner GD. Identification of a thrombin sequence with growth factor activity on macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 976-80
- 13 Bauters C, Lablanche JM, McFadden EP, Leroy F & Bertrand ME. Clinical characteristics and angiographic follow-up of patients undergoing early or late repeat dilation for a first restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 845-8
- 14 Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 2001; 81: 999-1030
- 15 Berridge MJ & Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341: 197-205
- 16 Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR & Hofsteenge J. The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J* 1989; 8: 3467-75
- 17 Bode W, Turk D & Karshikov A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci* 1992; 1: 426-71
- 18 Born GV. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1962; 162: 67-8
- 19 Bornfeldt KE & Krebs EG. Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 1999; 11: 465-77
- 20 Brass LF. Issues in the development of thrombin receptor antagonists. *Thromb Haemost* 1995; 74: 499-505
- 21 Bretschneider E, Braun M, Fischer A, Wittpoth M, Glusa E & Schror K. Factor Xa acts as a PDGF-independent mitogen in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2000; 84: 499-505

- 22 Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Nowak G, Glusa E & Schrör K. Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1441-6
- 23 Bretschneider E, Wittpoth M, Weber AA, Glusa E & Schrör K. Thrombin but not thrombin receptor activating peptide is mitogenic for coronary artery smooth muscle cells. *Thromb Res* 1997; 87: 493-7.
- 24 Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S & Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 1999; 18: 664-74
- 25 Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence JC, Jr. & Abraham RT. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J* 1996; 15: 5256-67
- 26 Burgun C, Esteve L, Humblot N, Aunis D & Zwiller J. Cyclic AMP-elevating agents induce the expression of MAP kinase phosphatase-1 in PC12 cells. *FEBS Lett* 2000; 484: 189-93
- 27 Bydlowski SP, Pares MM, Soares RP & Lopes AA. Stimulation of human smooth muscle cell proliferation by thrombin involves increased synthesis of platelet-derived growth factor. *Chest* 1998; 114: 236-40
- 28 Carney DH, Glenn KC & Cunningham DD. Conditions which affect initiation of animal cell division by trypsin and thrombin. *J Cell Physiol* 1978; 95: 13-22
- 29 Chambard JC, Paris S, L'Allemain G & Pouyssegur J. Two growth factor signalling pathways in fibroblasts distinguished by pertussis toxin. *Nature* 1987; 326: 800-3
- 30 Chamley-Campbell J, Campbell GR & Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979; 59: 1-61
- 31 Chao BH, Kalkunte S, Maraganore JM & Stone SR. Essential groups in synthetic agonist peptides for activation of the platelet thrombin receptor. *Biochemistry* 1992; 31: 6175-8
- 32 Chen LB & Buchanan JM. Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 131-5
- 33 Chen LB, Teng NN & Buchanan JM. Mitogenicity of thrombin and surface alterations on mouse splenocytes. *Exp Cell Res* 1976; 101: 41-6
- 34 Cherington PV & Pardee AB. Synergistic effects of epidermal growth factor and thrombin on the growth stimulation of diploid Chinese hamster fibroblasts. *J Cell Physiol* 1980; 105: 25-32

- 35 Cichowski K, McCormick F & Brugge JS. p21rasGAP association with Fyn, Lyn, and Yes in thrombin-activated platelets. *J Biol Chem* 1992; 267: 5025-8
- 36 Clagett GP, Robinowitz M, Youkey JR, Fisher DF, Jr., Fry RE, Myers SI, Lee EL, Collins GJ, Jr. & Virmani R. Morphogenesis and clinicopathologic characteristics of recurrent carotid disease. *J Vasc Surg* 1986; 3: 10-23
- 37 Clapham DE & Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 167-203
- 38 Clapham DE & Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 1993; 365: 403-6
- 39 Clohisy DR, Erdmann JM & Wilner GD. Thrombin binds to murine bone marrow-derived macrophages and enhances colony-stimulating factor-1-driven mitogenesis. *J Biol Chem* 1990; 265: 7729-32
- 40 Cohen P. The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 459-65
- 41 Cook SJ, Rubinfeld B, Albert I & McCormick F. RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *EMBO J* 1993; 12: 3475-85
- 42 Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T & Gutkind JS. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 1995; 81: 1137-46
- 43 Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407: 258-64
- 44 Coughlin SR, Vu TK, Hung DT & Wheaton VI. Expression cloning and characterization of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18: 161-6
- 45 Cucina A, Borrelli V, Di Carlo A, Pagliei S, Corvino V, Santoro-D'Angelo L, Cavallaro A & Sterpetti AV. Thrombin induces production of growth factors from aortic smooth muscle cells. *J Surg Res* 1999; 82: 61-6
- 46 Cucina A, Borrelli V, Lucarelli M, Sterpetti AV, Cavallaro A, Strom R, Santoro-D'Angelo L & Scarpa S. Autocrine production of basic fibroblast growth factor translated from novel synthesized mRNA mediates thrombin-induced mitogenesis in smooth muscle cells. *Cell Biochem Funct* 2002; 20: 39-46
- 47 Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A & Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 1997; 16: 7032-44

- 48 Daub H, Weiss FU, Wallasch C & Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996; 379: 557-60
- 49 Degen SJ, MacGillivray RT & Davie EW. Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin. *Biochemistry* 1983; 22: 2087-97
- 50 Dery O, Corvera CU, Steinhoff M & Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 1998; 274: C1429-52
- 51 DeSilva DR, Jones EA, Favata MF, Jaffee BD, Magolda RL, Trzaskos JM & Scherle PA. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol* 1998; 160: 4175-81
- 52 Donovan FM & Cunningham DD. Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem* 1998; 273: 12746-52
- 53 Du J, Brink M, Peng T, Mottironi B & Delafontaine P. Thrombin regulates insulin-like growth factor-1 receptor transcription in vascular smooth muscle: characterization of the signaling pathway. *Circ Res* 2001; 88: 1044-52
- 54 Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ & Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7686-9
- 55 Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F & Inagami T. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 8890-6
- 56 Ellis CA, Malik AB, Gilchrist A, Hamm H, Sandoval R, Voyno-Yasenetskaya T & Tiruppathi C. Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of Gi-linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 13718-27
- 57 Fallier-Becker P, Rupp J, Fingerle J, Betz E. Smooth muscle cells from rabbit aorta. Cell culture techniques in heart and vessel research. Piper HM, ed. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1990; 247-70.
- 58 Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W & Coughlin SR. Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *J Biol Chem* 2000; 275: 19728-34
- 59 Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA &

- Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 18623-32
- 60 Feng DM, Veber DF, Connolly TM, Condra C, Tang MJ & Nutt RF. Development of a potent thrombin receptor ligand. *J Med Chem* 1995; 38: 4125-30
- 61 Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA & Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253: 1129-32
- 62 Fields TA & Casey PJ. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 1997; 321: 561-71
- 63 Gallagher TF, Seibel GL, Kassis S, Laydon JT, Blumenthal MJ, Lee JC, Lee D, Boehm JC, Fier-Thompson SM, Abt JW, Soreson ME, Smietana JM, Hall RF, Garigipati RS, Bender PE, Erhard KF, Krog AJ, Hofmann GA, Sheldrake PL, McDonnell PC, Kumar S, Young PR & Adams JL. Regulation of stress-induced cytokine production by pyridinylimidazoles; inhibition of CSBP kinase. *Bioorg Med Chem* 1997; 5: 49-64
- 64 Garrington TP & Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 211-8
- 65 Gilman AG. Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep* 1995; 15: 65-97
- 66 Glenn KC, Carney DH, Fenton JW, 2nd & Cunningham DD. Thrombin active site regions required for fibroblast receptor binding and initiation of cell division. *J Biol Chem* 1980; 255: 6609-16
- 67 Glusa E. Inhibitoren der thrombininduzierten Blutplättchen- und zellulären Reaktion. *Nova Acta Leopold* 1999; NF 80: 83-94
- 68 Goel R, Phillips-Mason PJ, Raben DM & Baldassare JJ. alpha-Thrombin induces rapid and sustained Akt phosphorylation by beta-arrestin1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosphorylation is essential for G1 phase progression. *J Biol Chem* 2002; 277: 18640-8
- 69 Gospodarowicz D, Ferrara N, Haaparanta T & Neufeld G. Basic fibroblast growth factor: expression in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol* 1988; 46: 144-51
- 70 Graham DJ & Alexander JJ. The effects of thrombin on bovine aortic endothelial and smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 1990; 11: 307-12; discussion 312-3
- 71 Grand RJ, Turnell AS & Grabham PW. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J* 1996; 313: 353-68

- 72 Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 1998a; 273: 1839-42
- 73 Gutkind JS. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 1998b; 17: 1331-42
- 74 Gutkind JS. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE* 2000; 2000: RE1
- 75 Hamon M, Bauters C, McFadden EP, Wernert N, Lablanche JM, Dupuis B & Bertrand ME. Restenosis after coronary angioplasty. *Eur Heart J* 1995; 16 Suppl I: 33-48
- 76 Harden TK, Boyer JL & Dougherty RW. Drug analysis based on signaling responses to G-protein-coupled receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 2001; 21: 167-90
- 77 Hauck RW, Schulz C, Schomig A, Hoffman RK & Panettieri RA, Jr. alpha-Thrombin stimulates contraction of human bronchial rings by activation of protease-activated receptors. *Am J Physiol* 1999; 277: L22-9
- 78 Hedges JC, Yamboliev IA, Ngo M, Horowitz B, Adam LP & Gerthoffer WT. p38 mitogen-activated protein kinase expression and activation in smooth muscle. *Am J Physiol* 1998; 275: C527-34
- 79 Hollenberg MD & Compton SJ. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 203-17
- 80 Hombach V, Waltenberger J, Voisard R & Hoher M. Recurrent stenosis following coronary angioplasty. Clinical, cell biological and molecular aspects. *Z Kardiol* 1995; 84: 5-21
- 81 Houslay MD & Kolch W. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 659-68
- 82 Huang CL & Ives HE. Growth inhibition by protein kinase C late in mitogenesis. *Nature* 1987; 329: 849-50
- 83 Hung DT, Wong YH, Vu TK & Coughlin SR. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1992; 267: 20831-4
- 84 Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T & Coughlin SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 1997; 386: 502-6

- 85 Iyengar R. Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 1993; 7: 768-75
- 86 Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G & Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-8
- 87 Kahan C, Seuwen K, Meloche S & Pouyssegur J. Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *J Biol Chem* 1992; 267: 13369-75
- 88 Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C & Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998; 394: 690-4
- 89 Kalmes A, Deou J, Clowes AW & Daum G. Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580. *FEBS Lett* 1999; 444: 71-4
- 90 Kalmes A, Vesti BR, Daum G, Abraham JA & Clowes AW. Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ Res* 2000; 87: 92-8
- 91 Kanda Y, Mizuno K, Kuroki Y & Watanabe Y. Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol* 2001a; 132: 1657-64
- 92 Kanda Y, Nishio E, Kuroki Y, Mizuno K & Watanabe Y. Thrombin activates p38 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2001b; 68: 1989-2000
- 93 Kanthou C, Benzakour O, Patel G, Deadman J, Kakkar VV & Lupu F. Thrombin receptor activating peptide (TRAP) stimulates mitogenesis, c-fos and PDGF-A gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1340-7
- 94 Kanthou C, Kanse SM, Kakkar VV & Benzakour O. Involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins in alpha-thrombin signalling on cultured human vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 1996; 8: 59-66
- 95 Kanthou C, Parry G, Wijelath E, Kakkar VV & Demoliou-Mason C. Thrombin-induced proliferation and expression of platelet-derived growth factor-A chain gene in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1992; 314: 143-8
- 96 Karshikov A & Bode W. Electrostatic properties of thrombin: importance for structural stabilization and ligand binding. *Semin Thromb Hemost* 1993; 19: 334-43

- 97 Kawabata A, Kuroda R, Kuroki N, Nishikawa H & Kawai K. Dual modulation by thrombin of the motility of rat oesophageal muscularis mucosae via two distinct protease-activated receptors (PARs): a novel role for PAR-4 as opposed to PAR-1. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 578-84
- 98 Keffel S, Schmidt M, Bischoff A & Michel MC. Neuropeptide-Y stimulation of extracellular signal-regulated kinases in human erythroleukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 1172-8
- 99 Kinlough-Rathbone RL, Packham MA & Mustard JF. Vessel injury, platelet adherence, and platelet survival. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 529-46
- 100 Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S & Nishizawa Y. Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cell Physiol* 2001; 186: 1-10
- 101 Krymskaya VP, Hoffman R, Eszterhas A, Kane S, Ciocca V & Panettieri RA, Jr. EGF activates ErbB-2 and stimulates phosphatidylinositol 3-kinase in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999; 276: L246-55
- 102 Kupperman E, Wen W & Meinkoth JL. Inhibition of thyrotropin-stimulated DNA synthesis by microinjection of inhibitors of cellular Ras and cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4477-84
- 103 LaMorte VJ, Kennedy ED, Collins LR, Goldstein D, Harootunian AT, Brown JH & Feramisco JR. A requirement for Ras protein function in thrombin-stimulated mitogenesis in astrocytoma cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 19411-5
- 104 Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW & et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372: 739-46
- 105 Lin CC, Shyr MH, Chien CS, Wang CC, Chiu CT, Hsiao LD & Yang CM. Thrombin-stimulated cell proliferation mediated through activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in canine cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* 2002; 14: 265-75
- 106 Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA & Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res* 1991; 68: 106-13
- 107 Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS & Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 1997; 275: 394-7
- 108 Lüscher TF, Oemar BS, Yang Z & Noll G. Molecular and cellular mechanisms of arteriosclerosis and restenosis: possibilities of gene therapy. *Z Kardiol* 1996; 85: 495-508

- 109 Luttrell LM. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 375-82
- 110 Ma SF, Dixon EP, Reuning U, Little SP, Johnstone EM, Bang NU, Patterson CE & Garcia JGN. Molecular cloning of the bovine proteolytically-activated thrombin receptor. *J Invest Med* 1996; 44: A244
- 111 Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD & Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 245-82
- 112 Majumdar M, Seasholtz TM, Buckmaster C, Toksoz D & Brown JH. A rho exchange factor mediates thrombin and Galpha(12)-induced cytoskeletal responses. *J Biol Chem* 1999; 274: 26815-21
- 113 Manderson JA, Mosse PR, Safstrom JA, Young SB & Campbell GR. Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. I. Changes in smooth muscle phenotype. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 289-98
- 114 Mao J, Yuan H, Xie W, Simon MI & Wu D. Specific involvement of G proteins in regulation of serum response factor-mediated gene transcription by different receptors. *J Biol Chem* 1998; 273: 27118-23
- 115 Marinissen MJ & Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 368-76
- 116 McNamara CA, Sarembock IJ, Bachhuber BG, Stouffer GA, Ragosta M, Barry W, Gimple LW, Powers ER & Owens GK. Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: implications for atherosclerosis and restenosis. *Semin Thromb Hemost* 1996; 22: 139-44
- 117 McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW, 2nd, Coughlin SR & Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 94-8
- 118 Michel MC, Li Y & Heusch G. Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 363: 245-66
- 119 Michell RH. Inositol lipids and phosphates in growing, stimulated and differentiating cells. *Biochem Soc Trans* 1989; 17: 1-3
- 120 Mignatti P, Morimoto T & Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol* 1992; 151: 81-93
- 121 Miyata Y, Akashi M & Nishida E. Molecular cloning and characterization of a novel member of the MAP kinase superfamily. *Genes Cells* 1999; 4: 299-309

- 122 Nagao M, Yamauchi J, Kaziro Y & Itoh H. Involvement of protein kinase C and Src family tyrosine kinase in Galphq/11-induced activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 22892-8
- 123 Nakanishi S, Yano H & Matsuda Y. Novel functions of phosphatidylinositol 3-kinase in terminally differentiated cells. *Cell Signal* 1995; 7: 545-57
- 124 Naldini A, Carney DH, Bocci V, Klimpel KD, Asuncion M, Soares LE & Klimpel GR. Thrombin enhances T cell proliferative responses and cytokine production. *Cell Immunol* 1993; 147: 367-77
- 125 Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu TK, Charo IF & Coughlin SR. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest* 1992; 90: 1614-21
- 126 Neves SR, Ram PT & Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002; 296: 1636-9
- 127 Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C & Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9208-12
- 128 Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K & Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 504-8
- 129 Oka Y & Orth DN. Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest* 1983; 72: 249-59
- 130 Okazaki H, Majesky MW, Harker LA & Schwartz SM. Regulation of platelet-derived growth factor ligand and receptor gene expression by alpha-thrombin in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992; 71: 1285-93
- 131 Orsini MJ, Krymskaya VP, Eszterhas AJ, Benovic JL, Panettieri RA, Jr. & Penn RB. MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *Am J Physiol* 1999; 277: L479-88
- 132 Osherov N & Levitzki A. Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem* 1994; 225: 1047-53
- 133 Pang L, Sawada T, Decker SJ & Saltiel AR. Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 13585-8
- 134 Patterson C, Stouffer GA, Madamanchi N & Runge MS. New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res* 2001; 88: 987-97

- 135 Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ & Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 1991; 10: 885-92
- 136 Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K & Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22: 153-83
- 137 Pierce KL, Luttrell LM & Lefkowitz RJ. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 2001; 20: 1532-9
- 138 Pohjanpelto P. Stimulation of DNA synthesis in human fibroblasts by thrombin. *J Cell Physiol* 1978; 95: 189-94
- 139 Post GR & Brown JH. G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB J* 1996; 10: 741-9
- 140 Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C & Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999; 402: 884-8
- 141 Rabbani LE & Loscalzo J. Recent observations on the role of hemostatic determinants in the development of the atherothrombotic plaque. *Atherosclerosis* 1994; 105: 1-7
- 142 Rao GN, Delafontaine P & Runge MS. Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 27871-5
- 143 Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J & Van Obberghen-Schilling E. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett* 1991; 288: 123-8
- 144 Robinson MJ & Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-6
- 145 Rybalkin SD & Bornfeldt KE. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and human arterial smooth muscle cell proliferation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 424-34
- 146 Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK, Wheaton VI, Turck CW & Coughlin SR. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem* 1992; 267: 13146-9
- 147 Schmitt JM & Stork PJ. Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3671-83

- 148 Schwartz SM, Reidy MA & O'Brien ER. Assessment of factors important in atherosclerotic occlusion and restenosis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 541-51
- 149 Sears RC & Nevins JR. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* 2002; 277: 11617-20
- 150 Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD & Brown JH. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* 1999; 84: 1186-93
- 151 Seger R & Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-35
- 152 Shi CS & Kehrl JH. PYK2 links G(q)alpha and G(13)alpha signaling to NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 31845-50
- 153 Skaletz-Rorowski A, Waltenberger J, Muller JG, Pawlus E, Pinkernell K & Breithardt G. Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor-induced proliferation through mitogen-activated protein kinase in coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1608-14
- 154 Stork PJ & Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 258-66
- 155 Stouffer GA, Sarembock IJ, McNamara CA, Gimple LW & Owens GK. Thrombin-induced mitogenesis of vascular SMC is partially mediated by autocrine production of PDGF-AA. *Am J Physiol* 1993; 265: C806-11
- 156 Suidan HS, Nobes CD, Hall A & Monard D. Astrocyte spreading in response to thrombin and lysophosphatidic acid is dependent on the Rho GTPase. *Glia* 1997; 21: 244-52
- 157 Takahashi E & Berk BC. MAP kinases and vascular smooth muscle function. *Acta Physiol Scand* 1998; 164: 611-21
- 158 Tanaka K & Sueishi K. The coagulation and fibrinolysis systems and atherosclerosis. *Lab Invest* 1993; 69: 5-18
- 159 Tanner FC, Largiader T, Yang Z & Lüscher TF. Gene therapy in heart diseases. *Schweiz Med Wochenschr* 1999; 129: 1784-91
- 160 Taussig R & Gilman AG. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 1995; 270: 1-4
- 161 Taylor DS, Cheng X, Pawlowski JE, Wallace AR, Ferrer P & Molloy CJ. Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 1633-8

- 162 Thompson WD & Smith EB. Atherosclerosis and the coagulation system. *J Pathol* 1989; 159: 97-106
- 163 Toker A & Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997; 387: 673-6
- 164 Ullrich A & Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-12
- 165 van Corven EJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL & Moolenaar WH. Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1257-61
- 166 van Obberghen Schilling E, Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Lentès KU, Pavirani A & Pouyssegur J. Structure-activity analysis of synthetic alpha-thrombin-receptor-activating peptides. *Biochem J* 1993; 292: 667-71
- 167 van Obberghen-Schilling E, Chambard JC, Paris S, L'Allemain G & Pouyssegur J. alpha-Thrombin-induced early mitogenic signalling events and G0 to S-phase transition of fibroblasts require continual external stimulation. *EMBO J* 1985; 4: 2927-32
- 168 van Obberghen-Schilling E, Vouret-Craviari V, Chen YH, Grall D, Chambard JC & Pouyssegur J. Thrombin and its receptor in growth control. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 766: 431-41
- 169 Varela O, Martinez-Gonzalez J & Badimon L. The response of smooth muscle cells to alpha-thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 313-23
- 170 Vassallo RR, Kieber Emmons T, Cichowski K & Brass LF. Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J Biol Chem* 1992; 267: 6081-5
- 171 Vlahos CJ, Matter WF, Brown RF, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, Prossnitz ER, Ye RD, Marder P, Schelm JA, Rothfuss KJ & et al. Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 1995; 154: 2413-22
- 172 Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY & Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994; 269: 5241-8
- 173 Vouret-Craviari V, Van Obberghen-Schilling E, Rasmussen UB, Pavirani A, Lécocq JP & Pouyssegur J. Synthetic alpha-thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 95-102

- 174 Vouret-Craviari V, Van Obberghen-Schilling E, Scimeca JC, Van Obberghen E & Pouyssegur J. Differential activation of p44mapk (ERK1) by alpha-thrombin and thrombin-receptor peptide agonist. *Biochem J* 1993; 289: 209-14
- 175 Vu TK, Hung DT, Wheaton VI & Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991a; 64: 1057-68
- 176 Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I & Coughlin SR. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 1991b; 353: 674-7
- 177 Walker TR, Moore SM, Lawson MF, Panettieri RA, Jr. & Chilvers ER. Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 1007-15
- 178 Weiss RH & Apostolidis A. Dissociation of phosphatidylinositol-3 kinase activity and mitogenic inhibition in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 1995; 7: 113-22
- 179 Weiss RH & Maduri M. The mitogenic effect of thrombin in vascular smooth muscle cells is largely due to basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1993; 268: 5724-7
- 180 Widmann C, Gibson S, Jarpe MB & Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79: 143-80
- 181 Wilcox JN, Rodriguez J, Subramanian R, Ollerenshaw J, Zhong C, Hayzer DJ, Horaist C, Hanson SR, Lumsden A, Salam TA & et al. Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation. *Circ Res* 1994; 75: 1029-38
- 182 Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, Valeri CR, Ryan TJ & Faxon DP. Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation* 1987; 75: 636-42
- 183 Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW & Foster DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6642-6
- 184 Zhong C, Hayzer DJ, Corson MA & Runge MS. Molecular cloning of the rat vascular smooth muscle thrombin receptor. Evidence for in vitro regulation by basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1992; 267: 16975-9
- 185 Zwick E, Hackel PO, Prenzel N & Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 408-12

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Thrombin-Rezeptor PAR-1.	11
Abb. 2:	GPCR-Effektorproteine	14
Abb.3:	Signalnetzwerke G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	15
Abb. 4:	MAPK-Kaskaden: p44/42, JNK, p38 und BMK1	17
Abb. 5	Thrombin- <i>signalling</i> in Zellen des Blutgefäßsystems	21
Abb. 6:	Konzentrations-Wirkungskurve für den Thrombin-induzierten [³ H]-Thymidin-einbau.	36
Abb. 7:	Einfluss verschiedener TRAP auf den [³ H]-Thymidineinbau in SMC.....	38
Abb. 8:	[³ H]-Thymidineinbau in SMC induziert durch Thrombin, TRAP-6 und PAR-4-Peptid.....	39
Abb. 9:	Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors SB202190 auf den Thrombin-induzierten [³ H]-Thymidineinbau.....	41
Abb. 10:	[³ H]-Thymidineinbau nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml anti-PDGF-AK vor der Stimulation mit Thrombin oder PDGF-BB.	42
Abb. 11:	Zeitabhängige Stimulation der p44/42-MAPK durch Thrombin und TRAP-6 nachgewiesen mittels Western Blot.	44
Abb. 12:	Thrombin-induzierter [³ H]-Thymidineinbau nach Hemmung mit verschiedenen Konzentrationen des MEK-Inhibitors PD98059.	45
Abb.13:	Thrombin-induzierter [³ H]-Thymidineinbau nach Hemmung mit verschiedenen Konzentrationen des MEK-Inhibitors U0126.....	46
Abb. 14:	Zeitabhängige Stimulation der p44/42-MAPK durch Thrombin und TRAP-6 und Hemmung durch PD98059.....	47
Abb. 15:	Hemmung der Thrombin- bzw. TRAP-6-induzierten p44/42-MAPK-Aktivierung durch den MAPKK-Inhibitor U0126.	48
Abb. 16:	Einfluss eines anti-bFGF-Antikörpers auf DNA-Synthese und p44/42-MAPK-Phosphorylierung nach 30-minütiger Vorinkubation der Zellen mit 10 µg/ml anti-bFGF-AK vor Stimulation mit Thrombin, bFGF bzw. TRAP-6. (A) [³ H]-Thymidineinbaureate (B) p44/42-MAPK-Aktivierung.....	49

Abb. 17:	[³ H]-Thymidineinbau nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit konditioniertem Medium (CM)	51
Abb. 18:	Einfluss des EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 auf den Thrombin-induzierten [³ H]-Thymidineinbau.....	53
Abb. 19:	Der spezifische EGFR-Inhibitor AG1478 hat keinen Einfluss auf die Thrombin- bzw. TRAP-induzierte p44/42-MAPK-Aktivierung.	54
Abb. 20:	Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die MAPK-Phosphorylierung induziert durch Thrombin bzw. TRAP-6	55
Abb. 21:	Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die Thrombin- bzw. EGF-induzierte DNA-Synthese	56
Abb. 22:	Pertussis Toxin (PTX) zeigt keinen signifikanten Einfluss auf den Thrombin-induzierten [³ H]-Thymidineinbau	57
Abb. 23:	PTX zeigt keinen Einfluss auf die p44/42-MAPK-Aktivierung.	58
Abb. 24:	cAMP-Spiegel nach Stimulation von BCA-SMC mit Forskolin, Thrombin und TRAP-6.....	59
Abb. 25:	cAMP-Spiegel nach Stimulation von BCA-SMC mit PGE ₁ , Thrombin und TRAP-6.....	60
Abb. 26:	Hemmung der Thrombin- bzw. TRAP-6-induzierten p44/42-MAPK-Aktivierung nach Stimulation von BCA-SMC bei gleichzeitiger Gabe von Forskolin bzw. Prostaglandin E ₁ mit Thrombin bzw. TRAP-6	61
Abb. 27:	Zeitabhängige Stimulation der p38-MAPK durch Thrombin und TRAP-6	62

7.2 Lebenslauf

<u>Name:</u>	Ina-Gabriele Richter, geb. Wilke
<u>Wohnort:</u>	99819 Hörselberg-Großenlupnitz Im Wiesenhof 9 Telefon: 036920 /70702
<u>Geburtsdatum:</u>	20.03.1973
<u>Geburtsort:</u>	Arnstadt/Thüringen
<u>Familienstand:</u>	verheiratet, eine Tochter
<u>Schulbildung:</u>	1979-1989 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule Mihla 1989-1991 Ernst-Abbe-Oberschule Eisenach
<u>Berufsausbildung:</u>	1991-1993 Ausbildung zur Medizinisch-Technischen Laboratoriumsassistentin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen
<u>Hochschulstudium:</u>	1993-1995 Grundstudium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg (Lahn) in den Fächern: Biologie, Chemie, Physik, Anatomie, Physiologie und Biochemie Abschluss: Diplomvorprüfung 1995-1997 Hauptstudium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg (Lahn) mit dem Hauptfach Immunologie und den Nebenfächern Biochemie und Virologie Abschluss: Diplomhauptprüfung 1997-1998 Diplomarbeit im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen 2.11.1998 Abschluss des Studiums der Humanbiologie und Erlangung des akademischen Grades „Diplom-Humanbiologin“

beruflicher Werdegang:

seit Dezember 1998 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Experimentelle Angiologie am Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin der FSU Jena in Erfurt in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. E. Glusa; unterbrochen durch Mutterschutz und Erziehungsurlaub

Promotionsarbeit mit dem Thema: „Einfluss von Thrombin und Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (TRAP) auf die Mitogenese von Gefäßmuskelzellen: Untersuchungen zur Signaltransduktion“. Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Gl 178/3-1/Schr 194/10-1) unterstützt.

Veröffentlichung:

Santoso S., Kiefel V., Richter I.-G., Sachs U.J.H., Rahman A., Carl B., Kroll H.

A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the β_3 integrin: the Oe^a alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia.

Blood 2002; 99: 1205-1214

7.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Aumüller, Aurich, Beato, Elsässer, Fruhstorfer, Garten, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Jungclas, Kern, Kirchner, Klenk, Knöller, Koch, Koolman, Löffler, Lorberth, Müller R., Niessing, Röhm, Schachtschabel, Schäfer, Schrimpf, Schulz, Seitz J., Seitz K.A., Steinmetz, Suske, Truss, Voigt, von Löw, Waßmuth, Wesemann, Wolf

In Gießen:

Santoso

Und in Erfurt:

Bretschneider, Glusa

7.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil eines gemeinsamen durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Gl 178/3-1/Schr 194/10-1) unterstützten Projektes des Instituts für Experimentelle Angiologie am Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena in Erfurt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Schrör.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Erika Glusa für die Überlassung des Promotionsthemas, die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und die jederzeit gewährte überaus hilfreiche Unterstützung in jeder Hinsicht.

Herrn Prof. Dr. M. Wolf danke ich für die Erstellung des Gutachtens.

Frau Dr. Ellen Bretschneider danke ich für die anfängliche Hilfestellung und die anregenden Diskussionen zu Beginn der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Frau Marlies Laube und Frau Ingrid Wagner, die mir durch ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft das (Labor-) Leben sehr erleichtert haben. Bei Frau Ilona Rauch bedanke ich mich herzlich für ihre engagierte Unterstützung in organisatorischen Fragen. An dieser Stelle sei auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Angiologie für die angenehme Zusammenarbeit und die mir erwiesene Unterstützung gedankt.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. K. Schrör aus Düsseldorf für die kritische Durchsicht einer ersten Rohfassung des Manuskripts, Frau I. Rüter aus Düsseldorf für die Messung der cAMP-Proben und Herrn Dr. K. Pönicke aus Halle für die Messung der ADP-Ribosylierung.

Meinem Mann Jörg danke ich sehr herzlich für seine konsequente Unterstützung und den seelisch-moralischen Beistand während der gesamten Zeit.

Schließlich möchte ich es an dieser Stelle auch nicht versäumen, meiner Familie und insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester Anne-Kristin meinen Dank auszusprechen, da sie mich fortwährend in vielerlei Hinsicht unterstützten und motivierten, und damit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

7.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ina-Gabriele Richter, geb. Wilke, geboren am 20.03.1973 in Arnstadt, ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss von Thrombin und Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (TRAP) auf die Mitogenese von Gefäßmuskelzellen: Untersuchungen zur Signaltransduktion“ im Institut für Experimentelle Angiologie am Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena in Erfurt unter Leitung von Frau Prof. Dr. Erika Glusa in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. M. Wolf aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps-Universität Marburg ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt als Abstracts veröffentlicht und als Poster/Vortrag präsentiert:

Thrombin and thrombin receptor activating peptide are equipotent activators of p44/42-MAPK but only thrombin acts as a mitogen in vascular smooth muscle cells

Richter, I.-G., Bretschneider E., Glusa E., Schrör K.

Publiziert in Annals of Hematology 2000, Supplement I to Volume 79

44. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Freiburg, 16.-19.2.2000

Involvement of growth factors in thrombin induced mitogenesis of vascular smooth muscle cells

Richter, I.-G., Bretschneider E., Glusa E., Schrör K.

Publiziert in Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2000, Supplement to Volume 361, No 4

41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 21.-23.3.2000

Thrombin-induced mitogenesis in bovine vascular smooth muscle cells: Studies on the signaling pathway

Richter, I.-G., Glusa E.

Publiziert in Annals of Hematology 2002, Supplement 1 to Volume 81

46. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Erfurt, 20.-23.2.2002

Studies on the signaling pathway of thrombin induced mitogenesis in bovine vascular smooth muscle cells

Richter, I.-G., Glusa E.

Publiziert in Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2002, Supplement 1 to Volume 365

43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 12.-14.3.2002

Marburg, 29.10.2002